

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Neurobiologie



**Cirkadiánní systém pacientů  
s Alzheimerovou nemocí**

***Circadian system in patients with Alzheimer's  
disease***

diplomová práce

řešitel: Bc. Kamila Weissová

vedoucí: PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,.

Ráda bych poděkovala PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za vedení mé práce a odbornou pomoc, doc. MUDr. Aleši Bartošovi, Ph.D za ochotnou spolupráci, trpělivost a čas strávený výběrem a přesvědčováním jeho pacientů, aby se studie zúčastnili. Bez jeho zapojení do projektu by práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu oddělení Neurohumorálních regulací FGÚ AV ČR za mnoho cenných rad, trpělivou pomoc při práci i psychickou podporu. Velký dík patří i rodině, přátelům a Filipu Tylšovi za pomoc i podporu ve všech směrech.

# 1. ABSTRAKT

Alzheimerova nemoc (AN) je závažné neurodegenerativní onemocnění, které postihuje především starší populaci. Epidemiologické studie posledních let poukazují na výrazný nárůst této nemoci ve světové populaci, proto je důležité věnovat jí zvýšenou pozornost. Jejím nejvýraznějším projevem je narušení paměti, a to především její epizodické složky. Značně zatěžujícím projevem je však i narušení rytmu spánku a bdění. Nekonzistentní spánek narušovaný častými a různě dlouhými bdělými epizodami komplikuje domácí péči o pacienty a často bývá příčinou trvalé hospitalizace. Kromě zatížení okolí má nepravidelný nebo změněný spánkový rytmus i řadu negativních fyziologických dopadů na stav nemocného.

Střídání epizody spánku a bdění vykazuje výrazný denní rytmus. Vzhledem k tomu, že je spánkový režim řízen cirkadiánním systémem, opakují se tyto epizody v i neperiodickém prostředí s přibližně 24hodinovou periodou. Centrální cirkadiánní hodiny, které fungují jako endogenní oscilátor generující tento přibližně 24hodinový rytmus, jsou uloženy v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN). Řada studií poukazuje na možné narušení této struktury nebo jejích vstupních a výstupních drah způsobené neurodegenerativními změnami vyvolanými AN. Narušení funkce SCN ovlivní denní rytmus spánku a bdění, tvorbu melatoninu a také synchronizaci hierarchicky podřízených oscilátorů s podmínkami vnějšího prostředí, kterou SCN zprostředkovává. Ačkoliv je porucha spánkového režimu u pacientů s AN známa, její přímá souvislost s poruchou cirkadiánního systému nebyla dosud spolehlivě prokázána.

Klíčová slova: Alzheimerova nemoc, cirkadiánní rytmy, spánek, melatonin, hodinové geny

# ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a severe neurodegenerative disease that primarily affects the elderly population. Recently, epidemiological studies have pointed to significant increase in the disease cases within the world population, and therefore, it is important to pay more attention to it. The most distinctive symptom of AD is an impairment of memory, especially its episodic component. Apart from this, sleep-wake rhythm disturbance is also very burdensome symptom of this disease. An increasing sleep fragmentation during the night and an increasing number of naps during the day in AD patients represents one of the biggest complications for home caregivers. Therefore, sleep problems are one of the most common reasons for a permanent hospitalization of patients with AD. Apart from these difficulties for the patient's surroundings, the irregular and altered sleep-wake rhythm has also many negative physiological impacts on the patient's health.

The alternation in sleep and waking follows a prominent daily rhythm. The sleep-wake rhythm is driven by a circadian system and, therefore, the episodes of sleep and waking regularly alternate with approximately 24h period even in a non-periodic environment. Master circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus of hypothalamus (SCN). SCN is an endogenous oscillator that generates approx. 24 h rhythms. Many studies demonstrate that changes caused by neurodegenerative diseases such as the AD can disturb output and input pathways of the master circadian clock. Consequently, disruption of the SCN influences not only the wake-sleep rhythm, but also melatonin secretion and synchronization of hierarchically subordinated oscillators, which are also driven by the SCN, with an exogenous environment. Although the sleep disorder in patients with AD has been observed before, its relation to the circadian system hasn't been clearly proved yet.

Key words: Alzheimer disease, circadian rhythms, sleep, melatonin, clock genes

## Osnova

<b>1. ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>2. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>10</b>
3.1. Cirkadiánní rytmy .....	10
3.2. Savčí cirkadiánní pacemaker a periferní hodiny .....	10
3.3. Molekulární podstata cirkadiánních rytmů .....	13
3.4. Řízení spánku a role melatoninu .....	14
3.4.1. Regulace spánku.....	14
3.4.2. Melatonin a jeho role v cirkadiánním systému a v řízení spánku .....	19
3.5. Neuropsychiatrické a neurodegenerativní onemocnění spjaté s narušeným cirkadiánním systémem .....	21
3.5.1. Alzheimerova nemoc a stárnutí.....	22
3.5.1.1. Změny na úrovni spánku a aktivity .....	23
3.5.1.2. Změny SCN.....	25
3.5.1.3. Změny na úrovni epifyzy a sekrece melatoninu.....	27
<b>4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>29</b>
<b>5. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>30</b>
5.1. Účastníci studie .....	30
5.2. Sběr vzorků .....	30
5.3. Monitorování pohybové aktivity a spánkového režimu .....	31
5.4. Vyhodnocení záznamů pohybové aktivity a chování.....	32
5.4.1. Spánkové kalendáře.....	32
5.4.2. Aktigrafická analýza .....	32
5.5. Radioimunologické stanovení denního profilu hladiny melatoninu .....	34
5.5.1. Postup.....	34
5.6. Detekce mRNA hodinových genů v bukálních stěrech kvantitativní real time RT-PCR.....	35
5.6.1. Izolace celkové RNA .....	35
5.6.2. Syntéza cDNA.....	35

5.6.3.	Kvantitativní real-time RT-PCR .....	35
5.7.	Statistická analýza .....	36
<b>6.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
6.1.	Analýza pohybové aktivity a chování .....	38
6.1.1.	Záznam průměrné aktivity .....	38
6.1.2.	Aktogramy.....	39
6.1.3.	Vyhodnocení spánkových kalendářů .....	42
6.1.3.1.	Délka spánku .....	42
6.1.4.	Spánková analýza .....	43
6.1.5.	Analýza denního podřímnutí „nap analysis“ .....	45
6.2.	Denní profily hladin melatoninu .....	46
6.3.	Profily exprese hodinových genů .....	49
6.3.1.	Denní profil exprese hodinového genu <i>Per1</i> .....	49
6.3.2.	Denní profil exprese hodinového genu <i>Bmal1</i> .....	50
6.3.3.	Srovnání vzájemné fáze denních profilů exprese <i>Per1</i> a <i>Bmal1</i> .....	51
<b>7.</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>57</b>

**Seznam použitých zkratk:**

A1, 2 adenosinový receptor 1, 2

AIC Akaike information criterion, Akaikeho informační kritérium

AN Alzheimerova nemoc

ANOVA Analysis of variance, analýza variance

AVP arginin vasopresin

Bmal1 brain and muscle Arnt-like protein 1

cDNA cyklické DNA

CK1 $\epsilon$  kasein kináza1  $\epsilon$

Clock Circadian locomotor output cycles kaput

CNS centrální nervová soustava

CREB calcium/cAMP response element binding protein

Cry1,2 Cryptochrom

DMH dorzomediální hypothalamus

dmSCN dorsomedial suprachiasmatic nucleus, dorsomediální část suprachiasmatických jader

dsDNA double-stranded DNA, dvojvláknová DNA

EEG elektroencefalogram

eVLPO rozšířená (z angl. extended) ventrolaterální preoptická oblast

GABA  $\gamma$ -aminomáselná kyselina

GAPDH glyceraldehyd-3 fosfát dehydrogenáza

GRP gastrin-releasing peptid

LDT laterodorzální tegmentum

LC locus coeruleus

LH laterální hypothalamus

MCH melanin koncentrující hormon

MMSE Mini Mental State Examination

MT1, 2 melatoninový receptor 1, 2

NINCDS-ADRDA National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group

NREM non-REM

ORX orexiny

PACAP pituitary adenylate cyclase-activating polypeptid

Per1, 2 Period 1, 2



PPT pedunkulopontinní tegmentum

RAS retikulární aktivační systém

REM- rapid eye movement

RHT retinohypotalamický trakt

RIA radioimunologická analýza

Rora RAR-related orphan receptor A

RPL0 ribozomální protein 0

SCN suprachiasmatické jádro

SP substance P

SWS slow wave sleep, pomalovlnný spánek

TMN tuberomammillary nucleus, tuberomamilární jádra

VIP vasoaktivní intestinální peptid

VLPO ventrolateralní preoptická oblast

vlSCN ventrolateral suprachiasmatic nucleus, ventrolaterální část suprachiasmatických jader.

## 2. ÚVOD

Člověk žijící v moderní společnosti si často narušuje denní rytmus řadou aktivit provozovaných v nevhodnou denní dobu. Toto narušování časové regulace může výrazně ovlivnit vnitřní fyziologické procesy člověka. Přibývajícím množstvím psychiatrických onemocnění často souvisí se zrychlujícím se životním tempem a společenským tlakem vedoucím k psychickému a pracovnímu přetěžování. Nerespektování přirozených požadavků našeho těla, jako je pravidelný spánek, pravidelný příjem potravy atd., vede k narušení cirkadiálního systému, což může mít dopad na zdraví jedince a přispět k rozvoji řady tzv. civilizačních chorob, včetně některých psychiatrických onemocnění.

### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1. Cirkadiánní rytmy

Jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících život na Zemi je 24hodinový cyklus střídání světla a tmy. Na tyto pravidelné změny reagují organismy napříč rostlinnou i živočišnou říší vytvořením vnitřních rytmů s periodou velmi blízkou 24 hodinám. Perioda blízká délce jednoho dne vedla k označení těchto rytmů za cirkadiánní (z latinského *circa-přibližně, diem-denní*). Základním rysem a evoluční výhodou těchto rytmů je skutečnost, že nejsou řízeny pouze změnami vnějšího prostředí, ale jsou generovány autonomně endogenním systémem a přetrvávají i v neperiodickém prostředí, kdy tzv. „volně běží v čase“ (Hastings, 1997). Cirkadiánní oscilace jsou charakterizované vlastní amplitudou, fází a periodou  $\tau$  (tau). Na změny vnějšího prostředí jsou schopné flexibilně reagovat a podle vnějších změn se seřizovat. Za nejúčinnější synchronizátor (*zeitgeber*) je považováno světlo (Wever et al., 1983), ale velmi efektivně dokáže endogenní rytmy synchronizovat i příjem potravy, okolní teplota i řada dalších faktorů (Balzer and Hardeland, 1988; Stephan, 2002). Endogenní perioda je mezidruhově specifická, vykazuje však i variabilitu vnitrodruhovou. U člověka se délka endogenní periody pohybuje v rozpětí mezi 24,2 – 25 hodinami (Middleton et al., 1996).

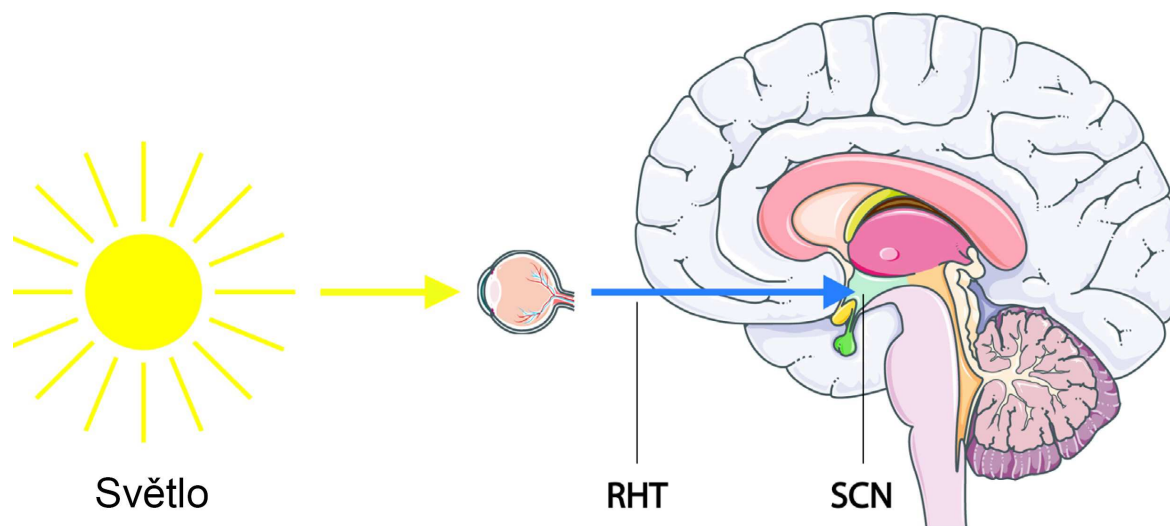
Vnitřní hodiny umožňují organismům předvídat pravidelně se opakující události. Na základě toho jsou schopné přizpůsobovat své chování i průběh řady fyziologických procesů. Nejen u člověka je známo, že cirkadiánní systém řídí například rytmus spánku a bdění, rytmus v příjmu potravy a s ním spojené fyziologické procesy, rytmické změny hladin některých hormonů, krevního tlaku nebo tělesnou teplotu (Takahashi et al., 2008).

#### 3.2. Savčí cirkadiánní pacemaker a periferní hodiny

Struktura, která je odpovědná za vznik a řízení endogenních rytmů v těle savců, se nachází v mozku dorzálně od optického chiasma a laterálně od třetí mozkové komory, v tzv. suprachiasmatických jádrech (SCN) (Rusak and Zucker, 1979). Jedná se o párová jádra, u člověka tvořená shlukem přibližně 100 000 těl neuronů, kde každý neuron je schopný generovat nezávisle na ostatních neuronech SCN vlastní rytmus. Jednotný výstupní cirkadiánní rytmický signál vzniká až na úrovni neuronální sítě (Liu et al., 1997a; Welsh et al., 1995). Jednoznačné potvrzení, že SCN jsou centrálním pacemakerem, prokázal

experiment, kdy byla u potkanů provedena bilaterální ablace těchto mozkových jader, jejímž výsledkem bylo trvalé vymizení cirkadiánního rytmu v pohybové aktivitě (Pickard and Turek, 1983). Později bylo také ukázáno, že chirurgická implantace SCN od dárce dokáže rytmus obnovit (Lehman et al., 1987).

Cirkadiánní systém lze zjednodušeně rozdělit na tři základní komponenty: vstupní dráhy, prostřednictvím kterých jsou hodiny seřizovány, vlastní pacemaker generující endogenní rytmus a výstupní signály řídící rytmické fyziologické procesy a chování (King and Takahashi, 2000; Lowrey and Takahashi, 2004). Světlo je nejvýznamnějším synchronizátorem hodin, jeho vstup do SCN je zprostředkován monosynaptickým propojením retiny a SCN, tzv. retinohypotalamickou dráhou (RHT) (Obr. 1). RHT je přímou odbočkou zrakové dráhy vedoucí nezářkovou projekci z fotosenzitivních gangliových buněk sítnice obsahujících fotopigment melanopsin (Gooley et al., 2001; Hannibal and Fahrenkrug, 2002; Hattar et al., 2002). Melanopsin transdukuje světlo na elektrický signál a posílá ho prostřednictvím RHT do SCN. Hlavním mediátorem přenosu je zde glutamát. Význam v přenosu signálu hrají i jeho kotransmitery, hypofyzární adenylát cyklázu aktivující protein (pituitary adenylate cyclaseactivating peptide, PACAP) a substance P (SP) (Chen et al., 1999; Hamada et al., 1999; Reppert and Weaver, 2002). Výlev mediátorů spustí reakční kaskádu vedoucí k synchronizaci oscilátoru (Ding et al., 1997).



*Obr. 1. Dráha vstupu světla do SCN. Světlo dopadající na gangliové buňky retiny přenáší signál pomocí RHT přímo do SCN, kde vyvolá jejich seřízení. Ilustrace upravená s využitím obrázků z Servier Medical Art ([www.servier.com](http://www.servier.com)).*

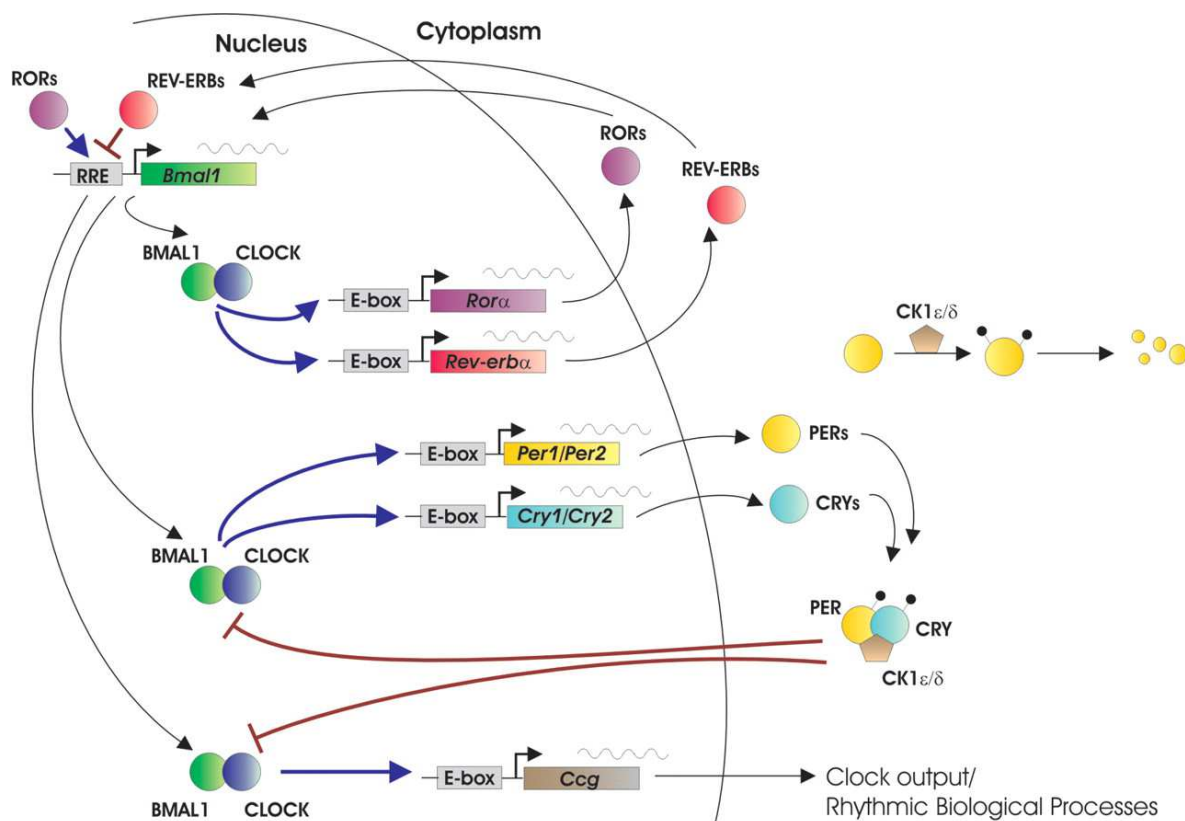
Morfologicky i funkčně lze centrální oscilátor rozlišit na několik částí. Ve ventrodorsálním směru se dělí na dorsomedialní (dmSCN) a ventrolateralní (vlSCN) (Leak and Moore, 2001). dmSCN je jinak také označováno jako „core“ (z angl.) a vlSCN jako „shell“ (z angl.). Obě podjednotky SCN jsou tvořeny funkčně odlišnými neurony, které jsou v rámci podjednotek vzájemně propojené. Neurony tvořící core produkují vasointestinalní polypeptid (VIP) a gastrin releasing peptid (GRP), zatímco neurony shell produkují především arginin-vasopresin (AVP). Většina neuronů SCN produkuje jako neuropřenašeč také kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) (Abrahamson and Moore, 2001; Albus et al., 2005). V rostrokaudálním směru se SCN funkčně dělí na populace neuronů v rostrální, mediální a kaudální části (Hazlerigg et al., 2005). Vzájemná komunikace mezi těmito podjednotkami se uplatňuje při mechanismu, jakým SCN reaguje na změnu fotoperiody. Na dlouhé fotoperiodě je exprese hodinových genů v kaudální části fázově předběhnuta oproti rostrální části. Dynamická změna ve vzájemné fázi jednotlivých částí SCN při změně délky fotoperiody by mohla pomáhat v rozpoznávání změny ročního období a dějů s nimi spjatými (Hazlerigg et al., 2005; Sosniyenko et al., 2009).

SCN není jedinou strukturou schopnou generovat vlastní rytmus, pravidelné oscilace vykazuje řada dalších struktur v centrálním nervovém systému i řada periferních orgánů jako jsou například plíce, srdce, střevo, játra, ledviny, kůže i jednotlivé buňky (Abe et al., 2002; Yoo et al., 2004). SCN jsou ovšem u savců centrálním pacemakerem, který je těmito ostatními oscilátory funkčně hierarchicky nadřazen. Odstraněním SCN dojde ke ztrátě rytmu v pohybové aktivitě a ke změně amplitudy nebo k desynchronizaci rytmu exprese některých hodinových genů. Sledování exprese hodinových genů periferních tkáních v *in vivo* podmínkách prokázalo, že jsou schopné si rytmickou expresi dlouhodobě udržet i nezávisle na signálech z SCN. SCN tak hrají roli především v udržení vnitřní synchronizace jednotlivých periferních oscilátorů (Yoo et al., 2004). Přesný mechanismus, jakým jsou rytmy na periférii z SCN seřizované, není dosud zcela jasný. Pravděpodobně jsou k tomu využívány jak neuronální, tak i humorální dráhy (Kalsbeek et al., 2006).

### 3.3. Molekulární podstata cirkadiánních rytmů

Endogenní rytmický signál generovaný cirkadiánním oscilátorem vzniká na úrovni jedné buňky. Celý mechanismus spočívá v oscilaci ve spínání hodinových genů. Rozdíl v mechanismu mezi centrálním a periferním oscilátorem je dán především mechanismem synchronizace těchto oscilací, v zásadě je však podobný (Yagita et al., 2001). Mechanismus oscilace probíhá na základě pozitivně a negativně se ovlivňujících transkripčně-translačních zpětnovazebních smyček (Obr 2). Mezi proteiny, které se podílejí na tvorbě endogenního rytmu, patří PER1,2 (period), CRY1,2 (cryptochrom), BMAL1, CLOCK, REV-ERB, RORa a kasein kinázy CKI $\delta$  a CKI $\epsilon$  (Golombek and Rosentein, 2010). Hladina CLOCK a CKI $\epsilon$  je v SCN konstantní (Lee et al., 2001). Expresí genů *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Cry2* je nejvyšší během subjektivního dne, expresí *Bmal1* dosahuje svého maxima během subjektivní noci. Expresí genů *Per1,2*, *Cry1,2*, *Rev-erba* a *Rora* je aktivována heterodimerem CLOCK/BMAL1. Expresi aktivuje přes E-box, který je součástí promotoru těchto genů. V cytoplazmě po translaci mRNA dochází účinkem CKI $\epsilon$  k fosforylaci PER proteinů. PER je pravděpodobně pomocí CRY stabilizován, zabraňuje jeho předčasné degradaci v proteasomu. Vzniklý komplex PER/CRY vstupuje do jádra, kde se váže na heterodimer CLOCK/BMAL1, čímž inhibuje jeho aktivační působení a následně tím negativně ovlivňuje expresi vlastního genu. Rytmus v expresi *Bmal1* je závislý na přítomnosti REV-ERBa, který je translokován z cytoplazmy zpět do jádra, kde se váže na RORE element v promotoru genu pro *Bmal1* a zabraňuje tím jeho expresi. RORa expresi *Bmal1* naopak aktivuje. Tímto mechanismem je uzavřena druhá negativní zpětnovazebná smyčka. Perioda, s jakou se tyto smyčky opakují, je přibližně 24 hodin (Golombek and Rosenstein, 2010).

E-boxy se nacházejí také na promotorech dalších genů. Tyto geny nejsou nezbytné pro molekulární chod hodin, ale jsou hodinovým mechanismem řízeny, a nazývají se proto hodinami kontrolované geny. Tyto rytmicky spínané geny zajišťují přenos cirkadiánního signálu z centrálního pacemakeru. Odhaduje se, že 5 až 10 % všech transkriptů v orgánech nebo tkáních je řízeno rytmicky (Jin et al., 1999; Storch et al., 2002). Velké množství z nich kóduje důležité proteiny, které se účastní regulace fyziologických funkcí (Lowrey and Takahashi, 2004).



Obr 2. Zjednodušený model molekulárního mechanismu hodin u savců. Heterodimery *CLOCK:BMAL1* aktivují transkripci *Per*, *Cry* a *Rev-erba*. Fosforylovaný komplex *PER:CRY* se váže na heterodimery *CLOCK:BMAL1* a tím inhibuje transkripci svých genů. Přídatná smyčka zahrnuje inhibici transkripce *Bmal1* prostřednictvím *REV-ERBa* a aktivaci jeho transkripce prostřednictvím *RORA*. Pro bližší porozumění viz text výše. Převzato z (Ko and Takahashi, 2006).

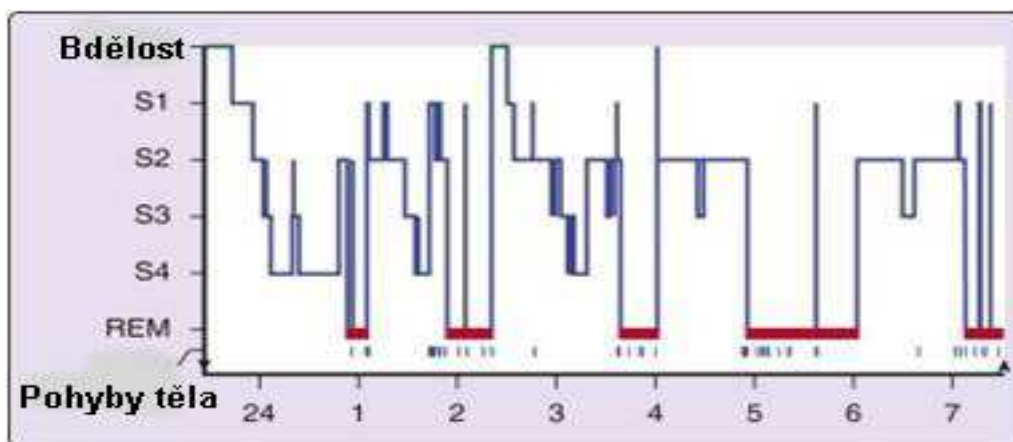
### 3.4. Řízení spánku a role melatoninu

Pravidelně opakující se cyklus spánku a bdění je pravděpodobně nevýraznějším a nejznámějším cirkadiánním rytmem. Jedná se ovšem o komplexní proces, za jehož rytmus je zodpovědná řada dalších faktorů a mnohé z nich jsou dosud neznámé.

#### 3.4.1. Regulace spánku

Spánek je komplexní fyziologický stav, který lze charakterizovat snížením vigility a sníženou senzorickou a svalovou aktivitou. Rozlišujeme dvě základní fáze spánku. První fáze je označovaná jako tzv. pomalovlnný spánek nebo také non-REM (NREM) fáze spánku. Druhá fáze je pojmenovaná podle typických rychlých očních pohybů „rapid eye movement

sleep“ (REM), které tuto fázi spánku doprovází (Obr. 3.). NREM je dále dělen do 4 stádií podle rozdílných vln na elektroencefalografickém záznamu (EEG) (Carskadon and Dement, 2000). EEG NREM spánku je charakterizováno synchronizovanou aktivitou pomalých spánkových vln v pásmu theta (4-8 Hz) a delta (0,5- 4 Hz) a specifickým výskytem spánkových vřeten a K-komplexů. První 2 stádia odpovídají postupnému usínání, spánek je mělký. V dalších 2 stádiích dochází k výraznému zpomalování frekvence, tento spánek bývá označován jako tzv. „slow wave sleep“ (SWS), a k nárůstu amplitudy vln na EEG. SWS je považován za nejhlubší spánek s pomalou kortikální aktivitou. NREM dominuje na počátku spánkového cyklu a tvoří 75-80% celkové doby spánku. REM je proti tomu definován aktivitou ve vysokofrekvenčních pásmech EEG, především v beta-rytmu (18-30 Hz). Během REM spánku je zachována schopnost kůry reagovat na senzorické podněty a míra její aktivity je srovnatelná se stavem bdělosti. Typicky se v REM fázi vyskytují sny a zabírá 20-25% celkové doby spánku (Carskadon and Dement, 2000). V poslední třetině spánku se procentuálně zvyšuje její zastoupení, což je spojováno s cirkadiánně regulovaným nárůstem tělesné teploty (Dijk and Czeisler, 1995).



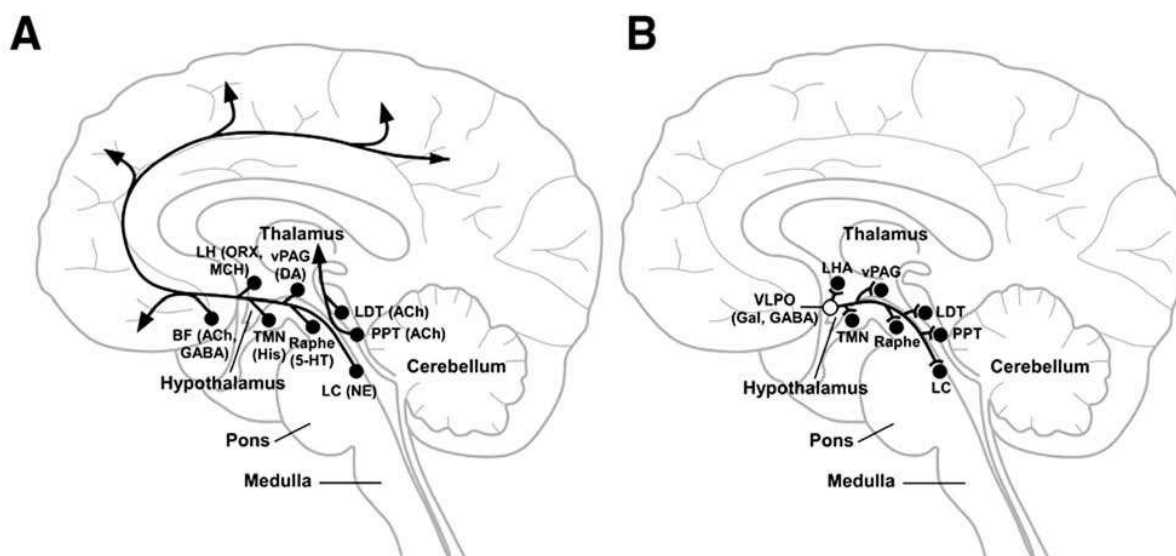
Obr. 3. Polysomnogram spánkové architektury. Záznam popisuje průběh spánku v čase a střídání jednotlivých fází spánku, NREM (S1, S2, S3 a S4) a REM spánek. V první části spánku výrazně převládá NREM, k ránu se více objevuje REM. Převzato a upraveno z (Carskadon and Dement, 2000).

Mechanismy spánku a jeho regulace jsou zatím objasněny jen částečně. Bdělост je spojována s aktivací vzestupného retikulárního aktivačního systému (RAS). Klíčovou roli v tomto systému hrají cholinergní neurony v pedunkulopontinní oblasti a neurony laterodorzálního tegmenta. Neurony z těchto jader tvoří hlavní excitační dráhy vedoucí



z mozkového kmene přes talamická jádra odkud potencují stimulaci kortikálních oblastí mozku. Vysokou aktivitu během bdělosti vykazují současně i monoaminergní skupiny neuronů, které inervují převážně oblast předního bazálního mozku, laterální hypotalamus a kortex (Obr. 4A). Tyto neurony pálí mnohem rychleji v době bdělosti než v průběhu NREM fáze spánku a většina z nich je během NREM fáze spánku zcela inaktivní (Fuller et al., 2006).

K iniciaci spánku je nejprve nutná inhibice RAS. Z nedávných studií vyplývá, že tuto inhibici by mohla zprostředkovávat ventrolateralni preoptická oblast (VLPO) v hypotalamu, která je během spánku aktivní a je tvořena převážně GABAergními neurony, které inervují mimo jiné i hlavní jádra RAS. Aktivita VLPO je během spánku výrazně zvýšená a právě těmito GABAergními dráhami dochází k inhibici RAS (Obr.4B) (Saper et al., 2005).

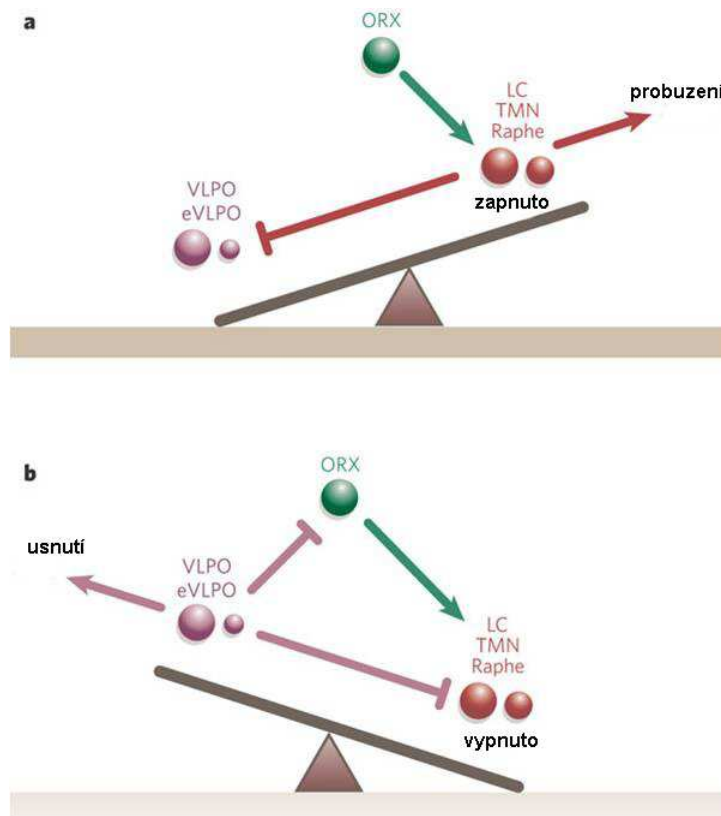


Obr. 4. (A) Vzestupé kortikální aktivační dráhy podílející se na bdělém stavu. Noradrenergní dráha z locus coeruleus (LC), cholinergní neurony v pedunculopontiním a laterodorsálním tegmentálním (PPT/LDT) jádře, serotoninergní neurony dorsálních rapheálních jader (DR), dopaminergní neurony ventralní periaquedukální šedi (vPAG), a histaminergní neurony tuberomammilárních jader (TMN). (B) Schéma neuronálních projekcí VLPO aktivních především během spánku. Přenos zprostředkovávají především inhibiční neurotransmitery GABA a galanin. Obě dráhy jsou ovlivňované z laterálního hypotalamu (LH) produkujícího orexiny (ORX) a melanin koncentrující hormon (MCH). Převzato z (Fuller et al. 2006).

Další systém uplatňující se při regulaci spánku se nachází v laterálním hypotalamu (LH). Obsahuje důležitou populaci neuronů produkujících orexiny (nebo také hypocretiny). Tyto neurony mají projekce do kortikálních oblastí, bazálního mozku a současně i do aktivační

oblasti mozkového kmene (Sherin et al., 1996). Jsou aktivní během bdělosti a stimulují pomocí orexinů tuberomamilární jádra, locus ceruleus a dorzální jádra raphe, odkud vedou monoaminergní projekce především do kortexu. Těmito drahami potencují RAS, čímž přispívají k udržení bdělého stavu (Estabrooke et al., 2001; Peyron et al., 1998). Další skupina neuronů LH, jejíž aktivita se mění v závislosti na bdělém stavu, jsou neurony produkující melanin koncentrující hormon (MCH). Mají spoje s podobnými strukturami jako orexinergní neurony, ale nejvyšší aktivitu vykazují během REM fáze spánku (Lee et al., 2005). Zároveň LH současně produkuje neurotransmitter GABA. K jehož uvolňování z této struktury dochází výrazně intenzivněji v průběhu spánku (Nitz and Siegel, 1996). GABA svým účinkem tlumí aktivitu monoaminergních neuronů a potlačuje tvorbu orexinů, zvýšení aktivity GABAergních neuronů tedy přispívá k přechodu a stabilizaci spánku (Alam et al., 2005).

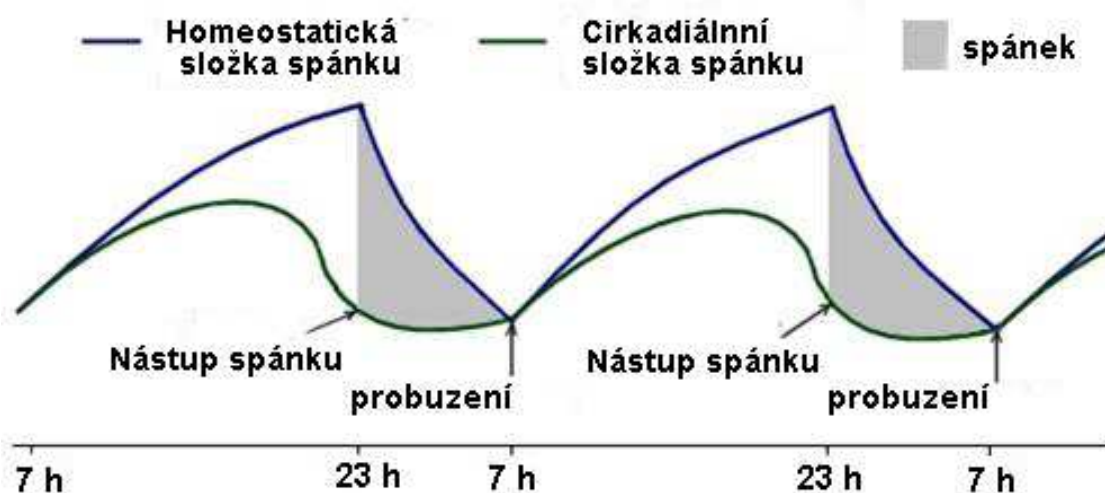
Zatímco na bdělém stavu se podílí řada neuronálních drah a mozkových jader, na přechodu ke spánku a na jeho udržení se pravděpodobně podílí jen několik málo struktur. Roli zde hraje výše zmíněná populace neuronů produkujících orexiny v laterálním hypotalamu a VLPO v hypotalamu (Sherin et al., 1996). Aktivita VLPO je během spánku několikrát zvýšená, a to především během REM fáze spánku. Lézí této oblasti dojde k polovičnímu snížení výskytu REM fáze a k daleko častějšímu střídání spánku a bdění (Lu et al. 2000). Aktivita VLPO je inhibována noradrenergními a serotonergními vstupy. Tato oboustranná interakce mezi VLPO a RAS prostřednictvím monoaminergních drah umožňuje střídání mezi bdělým stavem a spánkem. Přechod mezi těmito dvěma stavy probíhá bez jakéhokoliv mezistupně, proto je označován jako tzv. „flip-flop“ model (Obr. 5.). Pokud dojde k narušení některých komponent modelu, dochází k častějším přechodům mezi oběma stavy. Stabilita tohoto systému je významně ovlivňovaná orexiny. Na VLPO se sice nenacházejí orexinové receptory, ale dokází je ovlivňovat nepřímo přes monoaminegні vstupy. Orexinové receptory se nacházejí na presynaptickém zakončení monoaminergních drah vedoucích do VLPO. Působení orexinů na tyto receptory způsobuje zvyšování výlevu monoaminergních neurotransmiterů, které následně utlumují aktivitu VLPO. Orexiny tak nepřímo působí jako stabilizátory bdělého stavu tím, že zabraňují přechodu ke spánku (Saper et al., 2001). Experimentálně navozená absence orexinových receptorů nebo vyřazení funkce genu pro tvorbu orexinů vedlo k častým přechodům mezi spánkem a bděním (Mochizuki et al., 2004). Nízká hladina orexinů v cerebrospinální tekutině a snížený počet orexigenních neuronů v LH se pravděpodobně u člověka podílejí na narkolepsii. Typickým projevem této nemoci jsou právě náhlé přechody mezi spánkem a bděním (Nishino et al., 2001; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000).



Obr.5. Orexiny regulovaný „flip- flop“ model spánku stabilizující přechod mezi spánkem a bděním. A) znázorňuje pozici modelu během bdění. Monoaminergní jádra (červeně) inhibují ventrolaterální preoprcká oblast (VLPO, fialově), čímž dojde ke snížení inhibice orexin produkujících neuronů (ORX, zeleně). Během spánku (B) aktivita VLPO inhibuje monoaminergní jádra a ORX neurony. Výsledkem těchto interakcí je ostrý přechod mezi jednotlivými stavy, který je ovšem relativně nestabilní. Na stabilitě stavu se podílí orexinové neurony. eVLPO, rozšíření (z angl. “ extended“) ventrolateralní preoptické oblasti; LC, locus coeruleus; TMN, tuberomammilární jádra. Převzato a upraveno z (Saper et al., 2005).

Pro správné načasování a dostatečnou délku spánku je nutná kooperace 2 základních regulačních složek. Jedná se o složku homeostatickou, která od probuzení neustále narůstá a s dobou uplynulou od usnutí naopak klesá. Druhou složkou je složka cirkadiánní, která na rozdíl od homeostatické v průběhu 24 hodin pravidelně osciluje nezávisle na předchozí době spánku (Achermann and Borbely, 2003). Současné působení obou složek vede k nástupu spánku a k probouzení v době, kdy je na to organismus fyziologicky připraven (Obr. 6). Mechanismus, který řídí nárůst homeostatické složky, není zatím zcela objasněn. Pravděpodobně dochází k akumulaci tzv. somnogenů, tedy látek indukujících spánek. Kandidátní látkou by mohla být molekula adenosinu, metabolického produktu, jehož hladina s délkou bdělosti stále narůstá a během spánku opět klesá (Benington and Keller 1995;

Stacker et al. 2000). Jeho akumulace pravděpodobně působí přes adenosinové receptory 1 (A1), které působí inhibičně na inhibiční vstupy do VLPO, a přes adenosinové 2a receptory (A2a), které na VLPO působí stimulačně. Tímto mechanismem dochází ke zvýšení aktivity VLPO a tedy k posilování stability flip-flop modelu do stavu spánku. Zároveň stimulace A1 receptorů v RAS snižují aktivitu tohoto systému (Rainie et al. 1994). Cirkadiánní složka je řízena z SCN prostřednictvím spojů se strukturami regulujícími spánek. Hlavní výstupní dráhy z SCN podílející se na regulaci spánku a bdění vedou přes ventrální subparaventrikulární zónu hypotalamu do oblasti dorzomediálního hypotalamu (DMH) (Watts et al., 1987). Léze DMH vede k vymizení cirkadiánního rytmu spánku a bdění, pohybové aktivity, ale i k vymizení rytmického příjmu potravy nebo tvorby kortikosteroidu (Chou et al., 2003). Z DMH vedou jednak GABAergní dráhy inhibující aktivitu VLPO, a současně i glutamatergní dráhy do LH, kde stimulují tvorbu orexinů. Aktivace DMH ze SCN tedy vede k nastavení flip-flop modelu do pozice probuzení (Chou et al., 2003).



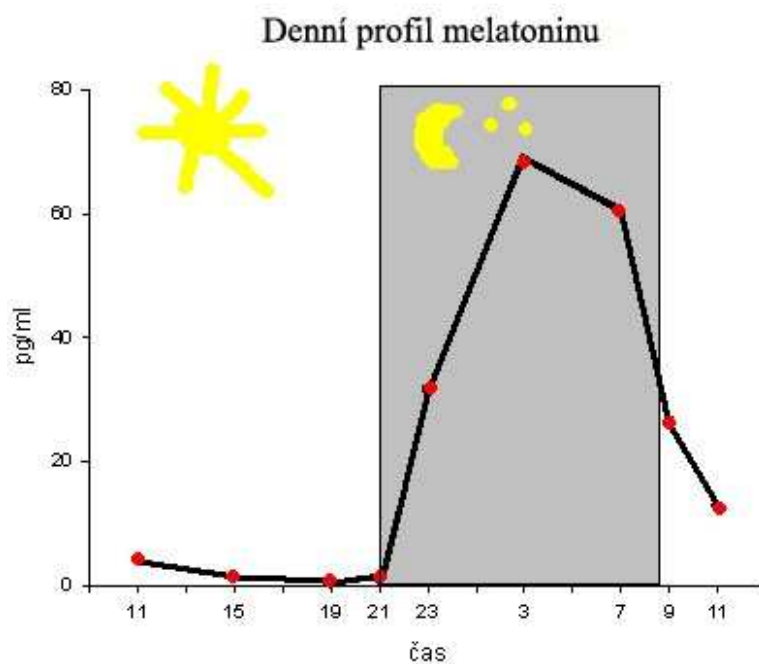
Obr. 6. Nástup spánku řízený homeostatickou (modrá) a cirkadiánní (zelená) složkou. Na ose x je znázorněn čas v hodinách. Spánek je vyznačen šedě. Převzato a upraveno podle Luke Mastin: *How sleep works* ([www.howsleepworks.com](http://www.howsleepworks.com)).

### 3.4.2. Melatonin a jeho role v cirkadiánním systému a v řízení spánku

Melatonin je hormon tvořený v epifýze v průběhu noci (Lerner et al., 1958; Reppert et al., 1979). Kromě toho je tvořen i v řadě periferních orgánů jako je gastrointestinální trakt, kostní dřeň, některé typy leukocytů, retina atd. (Alarma-Estrany and Pintor, 2007; Conti et al., 2000; Huether et al., 1992).

Je syntetizován z molekuly serotoninu dvoukrokovou přeměnou pomocí arylalkylamin *N*-acetyltransferázou na acetylserotonin a následnou *O*-methylovací hydroxyindol *O*-methyltransferázou na melatonin (shrnutí v Illnerová; 1996). Jeho tvorba je ovlivňována působením světla. Jednak percepce světla přes retinu tvorbu melatoninu přímo inhibuje (Illnerova et al., 1983) a jednak rytmus střídání světla a tmy nastavuje biologické hodiny v SCN a ty pak přes výstupní signály řídí rytmus tvorby melatoninu v epifýze. Propojení tvorby melatoninu s biologickými hodinami zajišťuje soustředění jeho produkce pouze do období noci (Klein and Moore, 1979) (Obr. 7.). S SCN je epifýza propojena polysynaptickou sympatickou dráhou vedoucí přes cervikální ganglion (Teclemariam-Mesbah et al., 1999). V SCN byly objeveny s G-proteiny spojené receptory MT 1 a MT 2, na které se melatonin váže (Reppert, 1997; Vaněček et al., 1987). Melatonin působí na SCN dvěma efekty. Skrze MT 1 receptory inhibuje neuronální aktivitu. Skrze MT 1 i MT 2 receptory způsobuje fázové posunutí pacemakeru (Liu et al., 1997b). Melatonin podaný exogenně má schopnost fungovat jako tzv. chronobiotikum, tj. látka schopná v závislosti na době užití fázově posunout cirkadiánní rytmus (Lewy et al., 1998). Tyto účinky melatoninu se využívají k léčbě jet lag syndromu nebo k synchronizaci nevidomých (Arendt et al., 1997; Sack et al., 2000).

Zda melatonin přímo ovlivňuje spánek - a případně jakým mechanismem - je stále nejasné. Do studia tohoto účinku melatoninu bylo vkládáno velké očekávání jakožto do potencionálního přirozeného hypnogenního léku, který bude udržovat fyziologicky nezměněnou strukturu spánku (Rajaratnam et al., 2004; Van Den Heuvel et al., 2005). Některé studie sice prokázaly, že exogenně podaný melatonin u některých jedinců zkracuje dobu usínání a prodlužuje dobu spánku (Zhdanova et al., 1996), avšak výsledky podobných studií bývají často rozdílné. Například v práci Asayama et al. mělo podávání melatoninu pacientům s AN pozitivní efekt na kvalitu spánku (Asayama et al., 2003), ovšem podobná práce žádný účinek na léčbu nezaznamenala (Dowling et al., 2008).



*Obr. 7. Denní profil melatoninu charakteristický minimálními denními hladinami a výrazným nočním nárůstem. Na ose y je koncentrace melatoninu v pg/ml, na ose x je čas. Graf vytvořen z vlastních dat K. Weissou.*

### 3.5. Neuropsychiatrické a neurodegenerativní onemocnění spjaté s narušeným cirkadiánním systémem

V současné době se ukazuje, že výrazně narůstá počet pacientů trpících jak neuropsychiatrickými onemocněními (především depresemi), tak i pacientů s některým z neurodegenerativních onemocnění (především AN). Tento fenomén by mohl být spjat se zhoršujícím se životním stylem, špatnou životosprávou, sníženou pohybovou aktivitou a nedodržováním spánkové hygieny. Všechny tyto faktory dokáží výrazně narušit cirkadiánní systém člověka a mohou vést k rozvoji obezity, nádorových onemocnění nebo k rozvoji duševních i neurodegenerativních poruch (Sahar and Sassone-Corsi, 2009; Turek et al., 2005; Wulff et al., 2010).

Narušení spánku nebo změna cirkadiánního rytmu spánku a bdění bývá často lékaři klasifikována jako komorbidní projev některých psychiatrických nebo neurodegenerativních onemocnění. Poruchy spánku a cirkadiánních rytmů běžně doprovázejí projevy afektivních poruch jako je sezónní depresivní porucha, unipolární a bipolární deprese. Na potíže se

spánkem si stěžuje přibližně 70-80 % takto nemocných pacientů. Změny spánku a aktivity často předcházejí relapsu nemoci. Dlouhodobé sledování změn spánku a denní aktivity umožňuje predikovat opětovný nástup nemoci (Bunney and Potkin, 2008; Pigeon et al., 2008). Další psychiatrické onemocnění, které bývá doprovázeno spánkovými i cirkadiánními abnormalitami, je schizofrenie. Změny spánku u schizofreniků jsou velmi variabilního charakteru. Studie sledující cirkadiánní systém schizofreniků popisují cirkadiánní změny od fázového zpoždění po fázové předběhnutí, volně běžící rytmy nebo zcela nepravidelné střídání spánku a bdění. (Mills et al., 1977; Monti et al., 2013; Wirz-Justice et al., 1997). Narušená spánková architektura i pravidelnost rytmu spánku a bdění bývá také popisována u neurodegenerativních onemocnění jako jsou AN, Huntingtonova nemoc, nemoc Lewyho tělísek a Parkinsonova nemoc. Neurodegenerativní změny v mozku související s usazováním různých forem nerozpustných proteinů jsou spojovány s rozpadem stability spánku i jeho rytmicity (Anderson and Bradley, 2013; Hastings and Goedert, 2013).

### **3.5.1. Alzheimerova nemoc a stárnutí**

AN patří mezi neurodegenerativní onemocnění, které výrazně ovlivňuje kognitivní funkce a chování. S rozvojem onemocnění dochází k atrofii nervové tkáně ve všech oblastech mozku. Selektivně jsou postiženy především cholinergní neurony, zejména pak neurony hlavního cholinergního jádra nucleus basalis Meynerti a jeho dráhy projíkáající do kůry mozku (Whitehouse et al., 1981). Zánik těchto neuronů je hypoteticky odpovědný za zhoršení kognitivních funkcí (Coyle et al., 1983). Na neurochemické úrovni dochází ke snížení tvorby acetylcholintransferázy, zodpovědné za syntézu acetylcholinu, a k deregulaci tvorby acetylcholinesterázy, enzymu řídícího degradaci acetylcholinu na synapsi (Iyo et al., 1997; Wilcock et al., 1982). Diagnostika této nemoci vychází primárně z kognitivních testů a výsledků magnetické rezonance (MRI). V MRI je pozorován úbytek mozkové hmoty, a to především v oblasti hipokampální formace, a zvětšení mozkových komor, což je dáno generalizovanou atrofií mozkové hmoty. K mozkové atrofii postihující i hipokampální formaci dochází současně i přirozeným stárnutím, tudíž se nejedná o zcela specifický diagnostický znak AN. AN lze definitivně potvrdit až post mortem nálezy v mozku. Hlavní patologií AN na mikroskopické úrovni je aglomerace dvou neurotoxických proteinů. Dochází k usazování a zvýšené tvorbě  $\beta$ -amyloidu. K jeho tvorbě dochází patologickým štěpením amyloidového prekurzorového proteinu, který má za fyziologických podmínek neuroprotektivní význam. Patologicky vzniklé oligomery jsou naopak velmi neurotoxické a

jejich polymerací vznikají v extracelulárních prostorách mozku tzv. alzheimerovské plaky, kolem kterých dochází k odumírání neuronů. Dalším typickým biologickým markerem AN je nadměrná fosforylace mikrotubulárního tau proteinu v neuronech. V defosforylované formě mikrotubuly stabilizuje, hyperfosforylací dojde ke vzniku stálých polymerních struktur, které tvoří základ neurofibrilárních uzlíčků, tzv. tangles. Postižené neurony poté zanikají (Hardy and Selkoe, 2002).

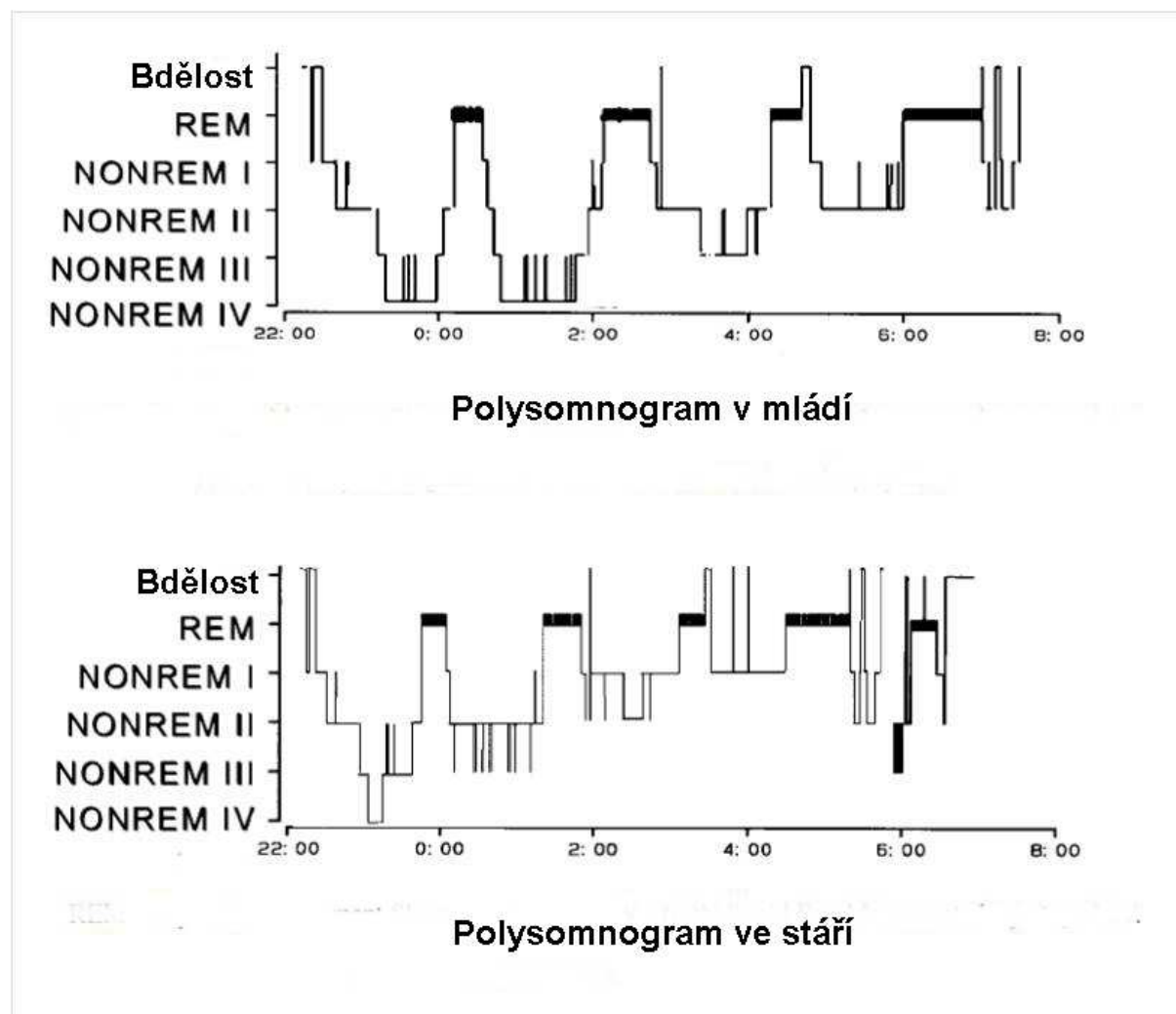
#### **3.5.1.1. Změny na úrovni spánku a aktivity**

Jak stárnutí, tak AN jsou spojovány s poruchami cirkadiánních hodin. Nejvýraznějším projevem cirkadiánního systému je rytmus spánku a bdění. Narušení tohoto rytmu se významně projevuje nejen na zhoršení kvality života postiženého, ale má i řadu negativních dopadů na celkovou fyziologii jedince. Společně s dalšími projevy AN může být narušený spánkový rytmus i důvodem k hospitalizaci pacienta.

Senioři i pacienti s AN si často stěžují na nekvalitní spánek nebo nespavost. Po 65. roce se uvádí, že tento problém postihuje více než 80 % zdravých jedinců (Foley et al., 1995), přičemž u pacientů s AN zastoupení jedinců s těmito problémy dále narůstá (Van Someren, 2000). Sledované změny spánku stárnoucí populace a pacientů s AN se projevují i na změně spánkové architektury. S přibývajícím věkem se zvyšuje procentuální zastoupení 1. a 2. stádia NREM spánku, dochází k úbytku 3. a 4. stádia (SWS) a ubývá i REM spánku (Redline et al., 2004) (Obr 8.). Stejný trend byl pozorovaný i u pacientů s AN, a zároveň s rozvojem onemocnění se tento trend dále prohluboval (Vitiello et al., 1990).

Změny spánkových parametrů vlivem stárání byly současně sledovány i u non-humánních denních primátů, *Macaca mulatta*. S vyžitím polysomnografického měření byl také u stárnoucích makaků prokázán signifikantní pokles SWS a REM fáze spánku. Současně docházelo k výrazné fragmentaci spánku a zvýšenému výskytu spánkových epizod během dne (Zhdanova et al., 2011).



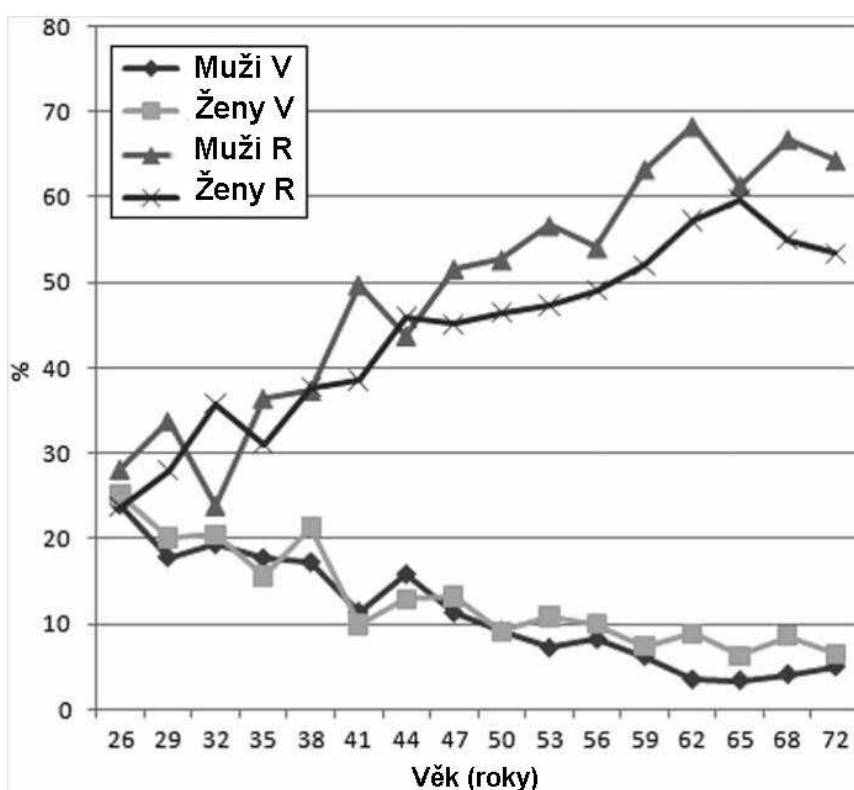


Obr. 8. Polysomnogram popisující typickou spánkovou architekturu u mladého jedince srovnaný s polysomnogramem starého člověka. Převzato z (Klauffke and Staedt, 2006).

Záznamy EEG aktivity v průběhu spánku u stárnoucí populace ukazují snížení amplitudy v pásmu delta typických pro SWS (viz kap. 3.4.1). Nedostatek nejhlubších spánkových stádií vede ke zhoršení kvality spánku a k jeho zvýšené fragmentaci (Bliwise, 2005). U pacientů s AN se zdá, že je narušení rytmu spánku ještě výraznější, prodlužuje se doba usínání, dochází k častějšímu probouzení během noci a bdělé epizody bývají delší než u zdravých seniorů. Stejný trend byl sledován i ve frekvenci a v délce denního zdřímnutí (Lee et al., 2007). Nejvýraznějším klinickým projevem patologie spánku u pacientů s AN je tzv. „sundowning“, fenomén projevující se nočním neklidem, zmatením, někdy až delirantním stavem. Co tento fenomén způsobuje, není zatím zřejmé. Některé práce poukazují na souvislost s narušeným cirkadiánním systémem pacientů (Gehrman et al., 2009). Pokusy o snížení tohoto projevu AN podáváním melatoninu vedlo k rozporupným závěrům (Cohen-Mansfield et al., 2000; Gehrman et al., 2009).

Narušení spánku u AN pravděpodobně souvisí s neurodegenerativními změnami, které postihují acetylcholinergní, glutamatergní i monoaminergní systém. Všechny tyto dráhy jsou významně zapojeny v RAS a podílejí se na řízení spánku (viz kap. 3.4.1.).

Další výraznou změnou ve stáří je posun spánkového režimu. S věkem dochází ke změně chronotypu, u starší populace se vyskytuje vyšší procento jedinců s tzv. brzkým chronotypem (Merikanto et al., 2012). Většina starších lidí se tak dříve ukládá ke spánku i dříve vstává (Obr. 9). Kromě posunu spánku u nich dochází i k dřívějšímu nárůstu tělesné teploty a k dřívější tvorbě kortizolu (Carrier et al., 2002; Sharma et al., 1989; Weitzman et al., 1983).



Obr. 9. Obrázek ilustrující změnu preference chronotypu s věkem. S věkem narůstá procento jedinců s brzkým chronotypem (R= ranní, V= večerní). Převzato a upraveno z (Merikanto et al. 2012).

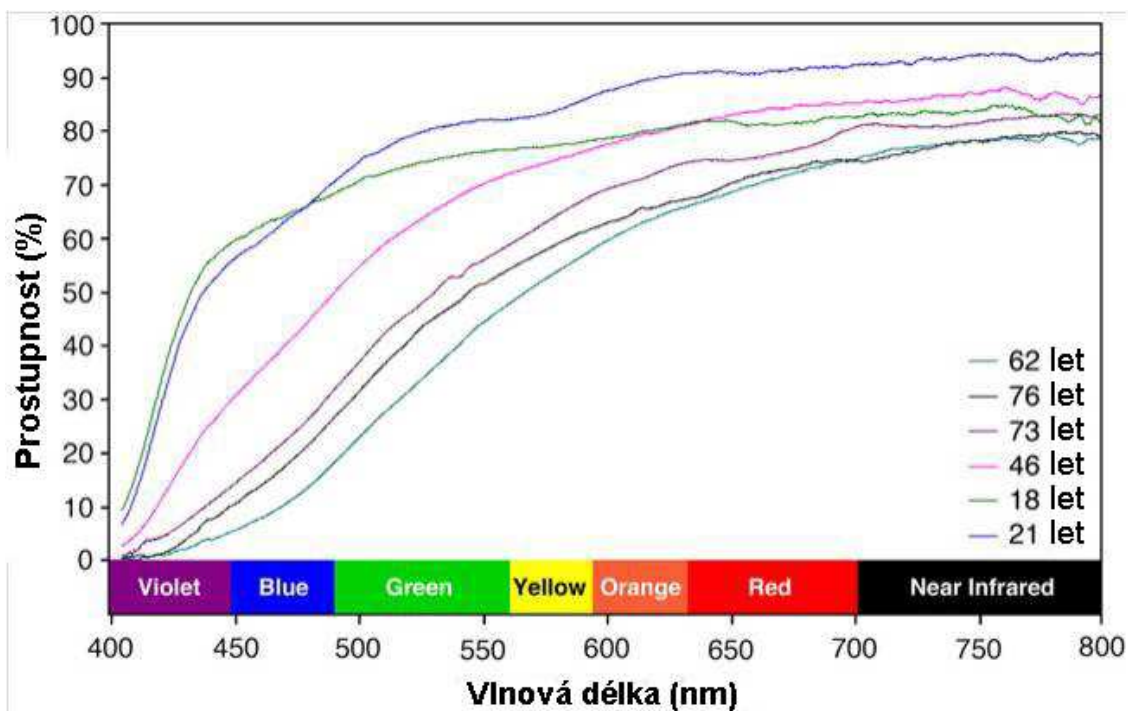
### 3.5.1.2. Změny SCN

Přímé změny v SCN u lidí je možné sledovat pouze při studiích prováděných posmrtně. Ty jsou sice vzhledem k neznalosti světelné historie jedince v mnoha ohledech limitující, ale

sledování morfologické změny struktury je celkem spolehlivé. Neurodegenerace mozkové tkáně provázející stárnutí nevylučuje ani postižení SCN. Dochází k úbytku neuronů zprostředkovávajících komunikaci mezi oběma částmi SCN, které jsou morfologicky i funkčně odlišné (viz kap. 3.2.). Post mortem prováděné studie u seniorů zaznamenaly snížení počtu neuronů v rámci celé neuronální sítě SCN. Byl popsán úbytek AVP, VIP i GABA neurotransmiterů. V SCN pacientů s AN dochází k dramatičtějšímu snižování počtu neuronů tvořících AVP (Hofman and Swaab, 1994; Wu and Swaab, 2007; Zhou et al., 1995). Dále dochází i k úbytku MT1 receptorů na SCN (Wu et al., 2006). Charakteristický výskyt tangles v SCN, typických pro AN, i výrazné neurodegenerace potvrzuje i studie Stopa et al. Amyloidní plaky, které jsou pro AN také typické, byly nalezeny jen zřídka (Stopa et al., 1999). Patofyziologické změny na úrovni SCN tak pravděpodobně mají vztah k narušené cirkadiánní rytmicitě stárnoucí populace i pacientů s AN.

Studie zaměřující se na změnu molekulárního hodinového mechanismu SCN lidí s AN zatím chybí, ovšem existují práce sledující změny profilů exprese hodinových genů v periferních oscilátorech CNS u pacientů s AN. Práce sledovaly expresi hodinových genů *Bmal1*, *Per1*, *Per2* v epifyze, ve striatu a cingulární korové oblasti. Cermakian et al. ve své práci prezentují existenci rytmů hodinových genů ve zmíněných strukturách a popisují také změnu ve fázi exprese hodinových genů mezi pacienty a kontrolní skupinou. To může poukazovat na nedostatečnou schopnost synchronizace ze SCN (Cermakian et al., 2011).

Vlivem stáří nebo degenerativních změn u AN může být modifikována i hlavní vstupní synchronizační dráha z retiny. S věkem dochází ke zhoršování světelné propustnosti čočky, a to především pro krátkovlnné záření, tj. především pro modrou složku světelného spektra, která má nejsilnější synchronizační účinek na SCN (Obr. 10.) (Kessel et al., 2010; Lupi et al., 2012). Neurodegenerace postihuje u pacientů s AN i fotoreceptivní a gangliové neurony sítnice (Sadun and Bassi, 1990). I v oblasti retiny jsou tyto změny pravděpodobně způsobeny usazováním  $\beta$ -amyloidu (Johnson et al., 2002).



Obr 10. Srovnání propustnosti oční čočky různě starých jedinců pro jednotlivé části světelného spektra. Osa y označuje světelnou propustnost v %, osa x vlnovou délku světelného spektra. Převzato a upraveno z (Kessel et al. 2010).

### 3.5.1.3. Změny na úrovni epifyzy a sekrece melatoninu

Hlavním produktem epifyzy je melatonin, jehož hladiny v těle vykazují cirkadiánní rytmus (viz kap. 3.4.2). Některé studie poukazují na pokles koncentrace a snížení amplitudy melatoninu během stárnutí (Zhao et al., 2002; Zhou et al., 2003b), ovšem tyto výsledky nejsou tak jednoznačné, jiné práce zaznamenaly buď žádný nebo téměř žádný pokles hladin melatoninu (Zeitzer et al., 1999). Signifikantní pokles hladiny melatoninu byl zjištěn i u stárnoucích primátů rodu *Macaca mulatta* (Zhdanova et al., 2011). Snížené hladiny melatoninu byly popsány i u pacientů s AN (Ferrari et al., 2000). V cerebrospinální tekutině pacientů s AN získané post mortem byl zjištěn pokles hladiny melatoninu až na pětinovou koncentraci ve srovnání s kontrolami (Liu et al., 1999). Zároveň bylo popsáno, že s rozvojem onemocnění se hladina melatoninu snižuje. Ke snížení produkce melatoninu dochází již při prvních náznacích projevu AN. Sledování změny hladiny melatoninu by tak mohlo být první známkou možného rozvoje AN (Wu and Swaab, 2005).

Snížení hladiny melatoninu by mohlo zpětně negativně ovlivňovat rozvoj AN. In vitro i in vivo studie poukazují na antioxidační a neuroprotektivní účinek melatoninu (Pappolla et al., 2000; Reiter et al., 2003). Podávání melatoninu myším modelům AN prokázalo snížení

patologické hyperfosforylace tau proteinu i snížení ukládání nerozpustného amyloidu  $\beta$  (Garcia-Mesa et al., 2012).

Během stárnutí dochází k prokazatelné kalcifikaci epifýzy (Gusek, 1983; Mahlberg et al., 2008). Tato strukturní změna epifýzy bývala považována za příčinu poklesu hladiny melatoninu ve stáří. Později byla přímá souvislost mezi kalcifikací epifýzy a nižšími hladinami melatoninu vyvrácena. Aktivita pinealocytů (epifyzárních buněk tvořících melatonin) se zdá být věkem neovlivněna (Bojkowski and Arendt, 1990).

U AN typicky dochází k akumulaci neurotoxických amyloidních plaků v mozkové tkáni, v epifýze jejich přítomnost prokázána nebyla. Současně zde nebyly zjištěny ani další neurodegenerativní změny, které postihují CNS pacientů. Změny v tvorbě melatoninu během stárnutí a AN by tak mohly být způsobeny nejspíše narušením noradrenergní dráhy propojující SCN a epifýzu (Jengeleski et al., 1989).

Přímá souvislost mezi změnou v hladinách melatoninu a narušením rytmu spánku a bdění během stárnutí a AN není objasněna. Některé práce totiž ukazují, že rytmus tvorby melatoninu nemusí být tak úzce spjat s rytmem spánku. Dřívější vstávání nemusí vždy souviset s dřívějším poklesem hladiny melatoninu. Může jít spíše o vzájemný fázový posun mezi spánkovým rytmem a výstupním rytmem centrálního oscilátoru. Bylo zjištěno, že starší lidé se ve srovnání s mladšími jedinci probouzejí v době, kdy je u nich ještě relativně vyšší hladina melatoninu, tedy probouzejí se nejen v dřívější denní dobu, ale i v dřívější cirkadiánní fázi (Duffy et al., 2002). Některé práce (viz výše) naopak snižování melatoninu ve stáří vyvracejí a tím nepřímou vyvracejí i možné změny v SCN, které by mohly s nižší hladinou melatoninu souviset.

## 4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit stav cirkadiánního systému u pacientů s AN a u kontrolních zdravých seniorů v přirozených podmínkách jejich domova.

Stav cirkadiánního systému byl posuzován na úrovni sledování:

- 1) behaviorální a spánkové rytmicity
- 2) rytmicity v endogenních ukazatelích, zejména v hladinách melatoninu ve slinách a v expresi hodinových genů *Per1* a *Bmal1* v buňkách ústní sliznice

## **5. MATERIÁL A METODIKA**

### **5.1. Účastníci studie**

Do studie byli vybráni pacienti léčení na Neurologické klinice Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Poradně pro poruchy paměti. AN byla u těchto pacientů diagnostikována podle mezinárodních diagnostických kritérií NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group). U všech pacientů byla klasifikována mírná forma AN. Kontrolní soubor zdravých subjektů byl tvořen především příbuznými pacientů (ve většině případů se jednalo o manžela/manželku), kteří s pacienty žijí ve společné domácnosti. Takto zvolené experimentální uspořádání umožnilo vytvořit soubor zdravých a nemocných subjektů s velmi podobnou věkovou strukturou a zároveň s vyrovnaným zastoupením obou pohlaví. Každá dvojice pacient/kontrola byla navíc vystavena stejným nebo velice podobným světelným podmínkám nejen během studie, ale i během dlouhého časového horizontu před jejím započatím.

Studie se zúčastnilo 13 párů, tj. 13 pacientů s Alzheimerovou nemocí a 13 zdravých seniorů jako kontrolní skupina. Průměrný věk účastníků studie byl  $78,5 \pm 1,27$  let. Všichni účastníci byli před započatím studie vyšetřeni krátkým testem kognitivních funkcí (MMSE; z angl. Mini Mental State Examination) ke zjištění aktuální mentální výkonnosti. Nikdo z účastníků studie neužíval léky, které by mohly ovlivnit spánek. Dalším vylučovacím kritériem bylo vystavení změněným světelným podmínkám, např. přeletem přes více časových pásem či práci na směny, a to v období 1 měsíce před započatím studie.

Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, pacienti byli poučeni o účelu studie a podepsali informovaný souhlas. Všichni účastníci do studie vstoupili dobrovolně, s právem z ní kdykoliv bez udání důvodu odstoupit.

### **5.2. Sběr vzorků**

Studie byla prováděna v domácím prostředí pacientů. Pacienti i zdraví kontrolní senioři byli požádáni, aby se během studie chovali zcela přirozeně a dodržovali svůj běžný denní i spánkový režim. Účastníci byli přesně instruováni, jak zabránit nežádoucímu osvětlení. Během noci, kdy si odebírali vzorky, byli vystaveni jen velmi tlumenému světlu (max. 50 lx). Po

celý den, kdy byly vzorky odebírány, měli účastníci zakázáno požívání nápojů obsahujících alkohol a kofein, žvýkání žvýkaček a čištění zubů. Jednu hodinu před odběrem vzorků nebylo povoleno pít ani jíst.

Odběry vzorků prováděli pacienti a kontrolní senioři sami podle instrukcí, které obdrželi na instruktážní schůzce před započítím odběrů. Byly jim zde též rozdány předem připravené sety obsahující potřebný materiál na odběry vzorků. Odběry poté prováděli všichni ve stejném termínu.

Vzorky slin a bukalní sliznice byly odebírány každé 4 hodiny během 24hodinové periody (viz Tab. 1.), počínaje 7. hodinou ranní. V každém odběrovém čase byly nejprve odebrány vzorky slin a poté byly prováděny stěry ústní sliznice. Sliny byly navíc odebírány i v 9:00 h a ve 21:00 h. Vzorky slin byly sbírány přímo do zkumavek, a to tak, že byl proveden vždy 1 odběr o objemu přibližně 1-3 ml slin. Celkově bylo odebráno 9 vzorků slin během 24 hodin. Stěry ústní sliznice se prováděly zvlášť z pravé a z levé strany vnitřní strany tváře pomocí cytologického kartáčku, přičemž každý z těchto stěrů byl umístěn do zvláštní zkumavky. Celkem tak bylo odebráno 7 stěrů, tj. 14 jednotlivých vzorků od každého subjektu.

čas (hodiny)	7:00	9:00	11:00	15:00	19:00	21:00	23:00	3:00	7:00
sliny	odběr	odběr	odběr	odběr	odběr	odběr	odběr	odběr	odběr
bukální stěry	odběr	X	odběr	odběr	odběr	X	odběr	odběr	odběr

Tab.1. Časový harmonogram odběrů slin a odběrů bukalních stěrů.

### 5.3. Monitorování pohybové aktivity a spánkového režimu

U pacientů i kontrolních subjektů byl po dobu 21 dní před odběry sledován spánkový režim. Sledování bylo provedeno jednak formou vlastních záznamů doby usínání a probouzení do spánkového kalendáře, jednak (u 6 pacientů a 4 kontrolních zdravých seniorů) byla sledována i pohybová aktivita pomocí objektivního aktigrafického měření. K těmto záznamům sloužila náramková zařízení Actiwatch AW4 model (Cambridge Neurotechnology Ltd, UK), která registrují pohyby těla. Subjektům byla tato zařízení propůjčena na dobu 21 dní předcházejícím odběrům biologických vzorků. Zařízení bylo umístěno na nedominantní ruce a bylo povoleno je sejmout pouze během sprchování, plavání nebo pobytu v sauně.



## **5.4. Vyhodnocení záznamů pohybové aktivity a chování**

### **5.4.1. Spánkové kalendáře**

Spánkové kalendáře sloužily jako subjektivní záznamy spánkového režimu v průběhu 24 hodin a byly vyplněny všemi účastníky studie. Záznam prováděli kontrolní subjekty (pečovatelé), a to jak za sebe, tak i za pacienta. Spánkový kalendář představoval diář s rozdělením každého dne do 30minutových úseků. Doba spánku pak byla vyznačena šrafováním jednotlivých okének ve spánkovém kalendáři, tedy s přesností na 0,5 hodiny.

### **5.4.2. Aktigrafická analýza**

Záznamy z aktigrafických přístrojů byly vyhodnocovány pomocí softwaru Actiwatch Activity & Sleep Analysis V 5.42. (Cambridge Neurotechnology Ltd, UK ). Tento software provádí na základě algoritmů jednotlivých programů analýzu spánku, vyhodnocení celkové aktivity a analýzu denního zdřímnutí (z angl. „nap“). Záznamy z Actiwatch byly pořizovány v jednodominutových úsecích.

Pro nastavení času usínání a času vstávání v softwaru provádějícím spánkovou analýzu byly využity záznamy ze spánkových kalendářů. V takto časově vymezených úsecích provedl software analýzu jednotlivých parametrů nočního spánku a analýzu denních zdřímnutí.

#### **Analýza parametrů během spánku**

Pro účely práce jsme během doby spánku sledovali následující parametry:

- a) předpokládanou délku spánku,
- b) skutečnou délku spánku,
- c) počet bdělých epizod,
- d) procentuální zastoupení skutečného spánku,
- e) procentuální zastoupení doby bdělosti,
- f) efektivitu spánku,
- g) fragmentační index.

Jednotlivé parametry jsou určeny následovně:

ad a) Předpokládaná délka spánku je definována jako časový rozdíl mezi začátkem a koncem spánku, vycházející ze spánkového kalendáře.

ad b) Skutečná délka spánku je délka spánku vypočítaná dle algoritmu analýzy. Je ekvivalentní délce spánku, od které je odečtena doba bdělosti.

ad c) Počet bdělých epizod odpovídá počtu událostí, které algoritmus identifikoval jako probuzení.

ad d) Procentuální zastoupení spánku vyjadřuje procento reálného spánku (tj. bez probuzení) z celkové délky spánku.

ad e) Procentuální zastoupení doby bdělosti vyjadřuje procento z celkové délky spánku odpovídající obdobím, kdy byl subjekt v bdělém stavu.

ad f) Efektivita spánku je procento z celkové doby strávené na lůžku, kdy vyšetřovaný skutečně spal.

ad g) Fragmentační index je vypočítáván jako procento jednominutových fází nehybnosti vztažené k celkovému počtu všech imobilních fází. Je využíván jako indikátor nočního neklidu.

### **Analýza parametrů během bdělosti**

Sledování denního zdřímnutí bylo prováděno s využitím "nap analýzy", která je součástí softwaru. Pro detekci denního zdřímnutí byl nastaven rozsah neaktivity v rozmezí 15-120 minut. Výsledky nap analýzy byly vždy srovnány se záznamy spánkových kalendářů, abychom mohli odlišit, zda během neaktivní fáze subjekt skutečně spal, nebo zda se jednalo o bdělý stav, kdy se subjekt pouze nepohyboval (např. sledoval televizi, četl knihu), a který by jinak byl programem vyhodnocen jako spánek.

Analýza celkové denní pohybové aktivity byla provedena na základě vyhodnocení záznamů snímaných v průběhu 21 dní. Data byla analyzována pomocí histogramové analýzy s periodou 30 minut.

Aktivita byla také zaznamenávána pomocí aktogramů, tj. grafických záznamu aktivity subjektu pro každý den. Záznamy byly upraveny do formátů zobrazení aktivity ve dvou po sobě jdoucích dnech na jeden řádek (tzv. "double plot"), což umožňuje přehledněji zobrazit průběh a fragmentaci pohybové aktivity během 24 hodin.

## **5.5. Radioimunologické stanovení denního profilu hladiny melatoninu**

Radioimunologická analýza (RIA) se používá pro kvantitativní stanovení hladin antigenu, nejčastěji hormonů. Využívá principu imunochemické reakce antigenu se specifickou protilátkou. V reakční směsi se nachází jednak neznámé množství antigenu vzorku a současně známá koncentrace přidaného antigenu značeného radioizotopem ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ , ...atd.). Oba antigeny kompetují o vazebné místo na protilátce. Množství vzniklého komplexu radioaktivně značený antigen + protilátka je nepřímo úměrné koncentraci stanovovaného antigenu. Po odmytí nenavázaného antigenu je intenzita záření změřena v scintilačním spektrometru. Pomocí roztoků o známé koncentraci, tzv. standardů, je vytvořena kalibrační křivka, ze které jsou vypočítány neznámé koncentrace sledovaného antigenu.

### **5.5.1. Postup**

Vzorky slin byly po odběrech zabaleny do hliníkové folie, která zamezovala průniku světla a tím i degradaci fotolabilního melatoninu. Až do doby měření pomocí RIA byly uloženy při  $-20^\circ\text{C}$ . Stanovení hladin melatoninu bylo prováděno pomocí kitu Buhlmann Direct Saliva Melatonin Radio Immunoassay test (Buhlman Laboratories, Schonenbuch, Switzerland). Tento kit obsahoval melatonin značený radionuklidem  $^{125}\text{I}$  (antigen), 5 roztoků o známé koncentraci melatoninu (standardů), primární a sekundární protilátku. Pokud jsme měli k dispozici dostatečné množství slin, byla všechna měření prováděna ve dvou paralelních stanoveních („doubletech“). Pro výpočet kalibrační křivky byly použity standardy s koncentrací radioaktivně značeného melatoninu 0,5 pg/ml, 1,5 pg/ml, 5 pg/ml, 15 pg/ml, 50 pg/ml. Jako negativní kontrola byl použit vzorek obsahující pouze inkubační pufr, radioaktivně značený melatonin a sekundární protilátku, bez přidání protilátky primární. Maximální vazba se používá po určení 100% hranice, kdy je protilátka obsazena pouze radioaktivním antigenem. Pro měření maximální vazby byl použit inkubační pufr, radioaktivně značený melatonin, primární i sekundární protilátka. Vzorek označovaný jako „total“ odpovídá radioaktivitě naměřené pouze v přítomnosti radioizotopem značeného antigenu. Po přidání  $^{125}\text{I}$  antigenu a primární protilátky následovala  $20\pm 4$  hodinová inkubace při teplotě  $2-8^\circ\text{C}$ , poté přidána suspenze tvořená sekundární protilátkou a pevnou bází. Po 15minutové inkubaci byly vzorky stáčeny v centrifuze chlazené na  $2-8^\circ\text{C}$  po dobu 5 minut při přetížení 2000g. Kapalina oddělená od pevné báze (supernatant) byla odsáta a takto

připravené vzorky byly vyhodnocené pomocí gama scintilačního spektrometru (Cobra II 5010, Packard).

## **5.6. Detekce mRNA hodinových genů v bukálních stěrech kvantitativní real time RT-PCR**

### **5.6.1. Izolace celkové RNA**

Vzorky byly sbírány do 1,5 ml mikrozkušavek obsahujících RNAlater (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) při pokojové teplotě a uchovány v teplotě -20°C, dokud nebyly zpracovány. Z těchto vzorků byla dále izolována mRNA pomocí Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Postup izolace byl proveden dle pokynů výrobce kitu.

### **5.6.2. Syntéza cDNA**

Izolovaná mRNA byla v 10 µl reakci metodou reverzní transkripce s použitím SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) převedena na cDNA.

Reakční směs pro reverzní transkripci (10 µl) byla tvořena:

- 5X VILO Reaction Mix 2 µl
- 10X SuperScript Enzyme Mix 1 µl
- RNA vzorku 2 µl
- RNA free voda 5 µl

Poté následovala 10minutová inkubace při pokojové teplotě (25°C), 60minutová inkubace v termobloku při 42°C a 5minutová inkubace v termobloku s 85°C. Vzorky byly následně zchlazeny několikaminutovým uložením na led. Získaná cDNA byla naředěna v poměru 1:2 s RNA-free vodou a uchovávána při teplotě -20°C.

### **5.6.3. Kvantitativní real-time RT-PCR**

Kvantitativní real-time RT-PCR je molekulární metoda, která se používá pro kvantitativní detekci specifických úseků nukleových kyselin (cDNA, ds DNA). Metoda je založena na mnohonásobné amplifikaci specifického úseku nukleové kyseliny pomocí enzymu DNA polymerázy. Amplifikace DNA je řízena krátkými specifickými DNA próbami, tzv. primery, které hybridizují s komplementární sekvencí na DNA v úseku cílového genu. K detekci množství

amplifikovaných úseků se využívají specifická fluorescenční barviva a sondy (např. SYBR Green, TaqMan sondy), které jsou schopné za určitých podmínek emitovat fotony. Narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství nukleové kyseliny ve vzorku. Na základě matematické analýzy získaných amplifikačních křivek lze poměrně přesně kvantifikovat počáteční množství templátových molekul ve vzorku.

Ve svém experimentu jsme stanovovali hladinu mRNA hodinových genů *Per1*, *Bmal1* a jako referenční konstitutivně exprimované geny, tzv. „housekeeping geny“, byly použity glyceraldehyd-3 fosfát dehydrogenáza (*GAPDH*) a ribozomální protein 0 (*RPL0*).

Každá kvantitativní real-time PCR probíhala v 16 µl reakci s využitím TaqMan technologie (TaqMan Gene Expression Master Mix and TaqMan Assays -Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). V reakci bylo vždy použito:

- naředěné cDNA vzorku 2 µl
- DNA polymeráza (HotFire DNA polymerase-Solis Biodyne) 3,1 µl
- Taqman eseje (taqman proba a reverse+forward primer) 0,6 µl
- RNA free voda 10,3 µl

Reakční směs byla napipetována do 96jamkové destičky, překryta folií a centrifugována. PCR probíhala v destičkovém LightCycleru Viia7 (Life Technologies, Foster City, CA, USA) podle cyklického programu s 50 opakováními.

Jako negativní kontrola byla použita kompletní reakční směs bez cDNA. Jako vnější standard byla použita cDNA z lidských fibroblastů, z které byla připravena ředicí řada (5x, 25x, 125x, 625x) pro jednotlivé geny. Z ředicí řady standardů byla pomocí metody druhé derivace maxima sestrojena kalibrační přímka. Hodnoty koncentrací mRNA všech genů byly kvantifikovány relativně vzhledem ke standardizační křivce. Tyto hodnoty byly poté kvantitativně vyjádřeny v poměru k průměrné hodnotě *GAPDH* a *RPL0*.

## 5.7. Statistická analýza

Data byla vyhodnocena základními statistickými metodami:

- aritmetický průměr:  $\bar{x} = \sum x_i / n$
- směrodatná odchylka:  $SD = \sqrt{(1/n - 1) * \sum (x_i - \bar{x})^2}$
- střední chyba průměru:  $S.E.M. = SD/n^{1/2}$

Statistická významnost rozdílů hladin mRNA, hladin melatoninu a aktivity v jednotlivých časových bodech během 24 hodinového cyklu mezi skupinami a v čase byla analyzována

pomocí dvojné analýzy variance (ANOVA) s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

Cosinorová analýza je metoda umožňující testovat hypotézu, že experimentální data lze fitovat na cosinovou křivku pomocí nelineární regrese podle rovnice:

$$Y = \text{mesor} + (\text{amplitude} * \cos(2 * \pi * (X - \text{acrophase}) / \text{wavelength});$$

přičemž *mesor* je průměrná hodnota dat, kolem které sinusoida osciluje, *amplituda* je rozdíl mezi maximální hodnotou a průměrem, akrofáze je fáze maxima cosinové křivky a *wavelength* je definována jako 24 hodin. Analýza umožňuje stanovení hodnot  $R^2$  (goodness of fit) a hladiny významnosti  $P$ . Pokud je  $P < 0,05$ , sledovaný profil odpovídá více cosinové křivce než horizontální linii a vykazuje tak cirkadiánní rytmus. Čím více se  $R^2$  blíží hodnotě 1, tím lépe jednotlivé body v profilu odpovídají cosinové křivce.

Ke srovnání akrofází jednotlivých hodinových genů mezi skupinami bylo použito statistické Akaikeho informační kritérium (AIC).

$$AIC = 2k - 2\ln L$$

Kde  $k$  je počet parametrů a  $L$  je maximální hodnota věrohodnostní funkce.

## **6. VÝSLEDKY**

### **6.1. Analýza pohybové aktivity a chování**

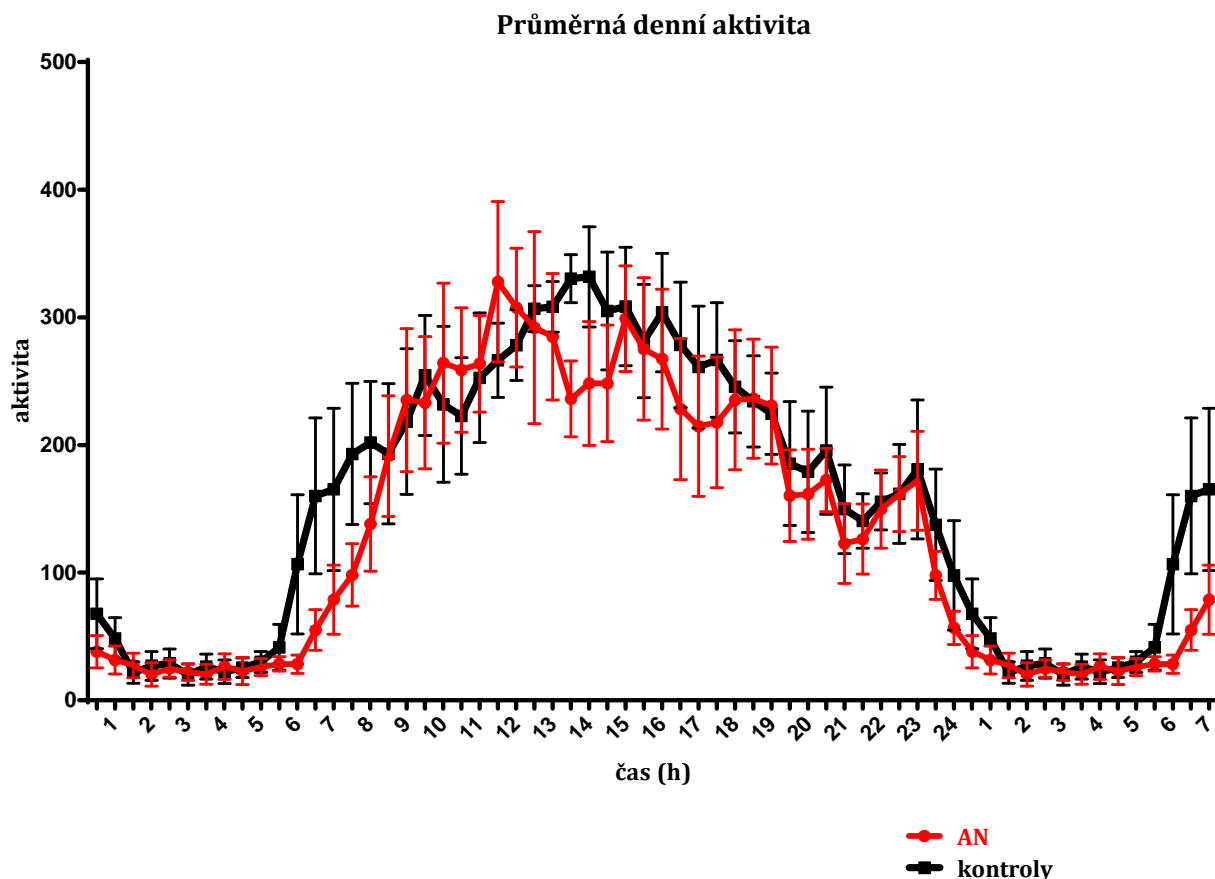
První část studie se zabývala sledováním pohybové aktivity a chování subjektů pomocí a) manuálního subjektivního zaznamenávání do spánkových kalendářů a b) automatického objektivního zaznamenávání využívajícího zařízení Actiwatch. Cílem bylo odhalit rozdíly v chování a pohybové aktivitě mezi pacienty s AN a kontrolními zdravými seniory.

#### **6.1.1. Záznam průměrné aktivity**

Automatickým monitorováním pohybové aktivity 6 pacientů a 4 zdravých seniorů jsme pomocí Actiwatch získali 21denní kontinuální záznam jejich pohybu. Ze získaných hodnot pro jednotlivé subjekty byl vypočítán aritmetický průměr a standardní chyba průměru (SEM) pro hodnoty v 30min intervalech během 24 hodin. Výsledky jsou znázorněny v Grafu 1.

Statistické porovnání průběhu aktivity u pacientů s AN a u zdravých seniorů pomocí dvojné ANOVA prokázalo statisticky významný vliv času na denní aktivitu ( $P < 0,001$ ) i signifikantní rozdíl aktivity mezi skupinami ( $P = 0,016$ ). Porovnání interakce mezi skupinami signifikantní výsledek neprokázalo.

Z výsledků tak vyplývá, že profil průměrné aktivity pacientů s AN se vůči kontrolám statisticky lišil, ovšem ANOVA neprokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami v jednotlivých časových bodech. Nicméně z grafického záznamu je u pacientů s AN patrný trend k pozdější ranní aktivitě a poklesu aktivity v odpoledních hodinách.

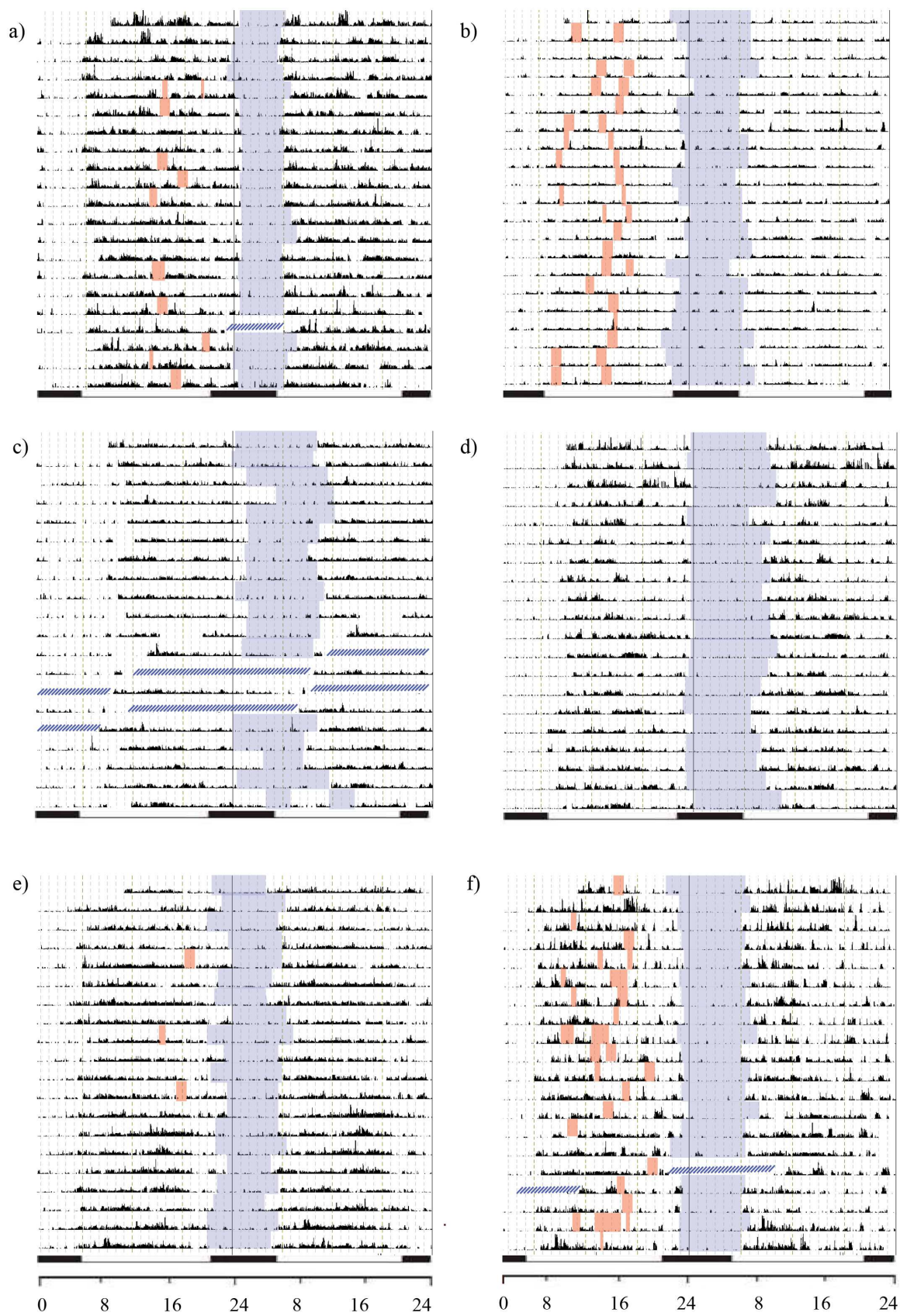


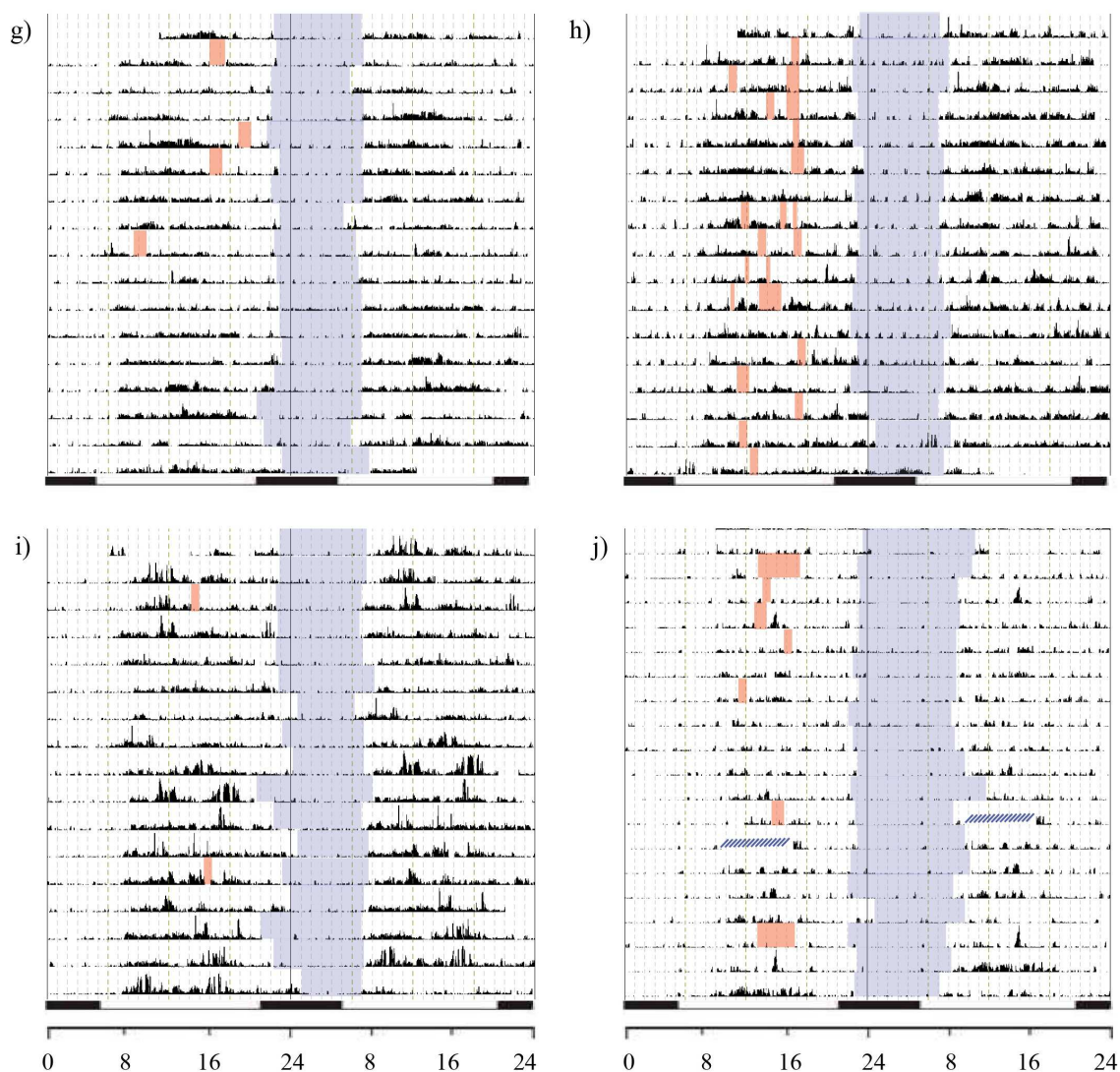
*Graf 1. Záznam průměrné pohybové aktivity ( $\pm$  SEM) u pacientů s AN (červeně) a kontrolních zdravých seniorů (černě). Na ose x je vyneseno čas v hodinách a osa y znázorňuje aktivitu naměřenou Actiwatch.*

### 6.1.2. Aktogramy

Záznamy aktivity znázorněné pomocí aktogramů ukazují dobu pohybové aktivity a její rozložení v průběhu 24 hodin získanou pomocí Actiwatch (Graf 2). Záznamy aktivity byly porovnávány se záznamy spánkových kalendářů. Epizody denního podřimnutí a doby spánku, označené zapisovatelem ve spánkovém kalendáři, jsou v aktogramech označeny barevně (modře noční spánek, červeně denní podřimnutí). Výsledky názorně ukazují míru fragmentace pohybové aktivity a délku spánku jednotlivých sledovaných subjektů.







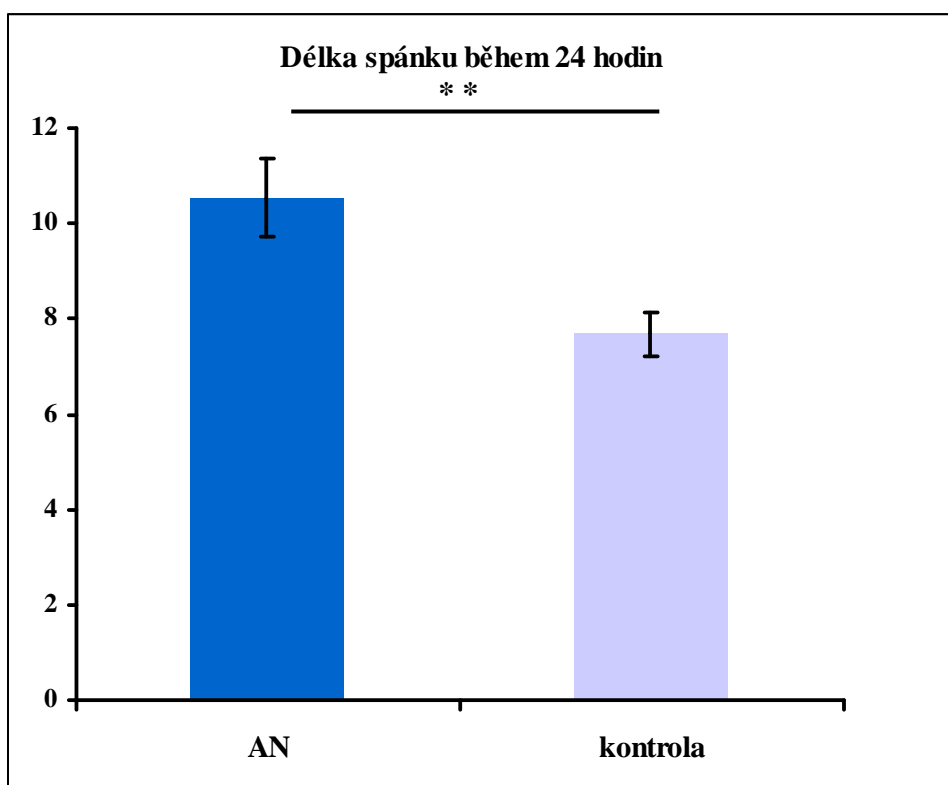
Graf 2. Jednotlivé záznamy pohybové aktivity kontrolních zdravých seniorů (a, c, e, g) a pacientů (b, d, f, h, i, j) získané pomocí Actiwatch s vyznačením doby spánku (modře) a denního podřímnutí (červeně) zaznamenané ve spánkových kalendářích. Záznamy a,b; c,d; e,f; g,h představují dvojici pacient-kontrola/pečovatel, kteří sdíleli jednu domácnost. C,d uvedli, že během dne nespí. Modré šrafování v aktogramu a), c), f) a j) označuje období, kdy subjekt omylem aktigraf odložil nebo přístroj dočasně nezaznamenával. Černé úseky jsou záznamem doby a délky pohybu. Denní podřímnutí je vyznačeno pouze v neduplikované podobě. Na dolní ose je znázorněn průběh času v hodinách v rámci dvou po sobě následujících dní. Černý úsek spodní lišty označuje dobu od západu k východu slunce, bílý úsek označuje délku světlé části dne.

### 6.1.3. Vyhodnocení spánkových kalendářů

#### 6.1.3.1. Délka spánku

Ze záznamu spánkových kalendářů, které jsme získali od všech 26 účastníků studie, jsme pro každého jedince vypočítali průměrnou celkovou dobu spánku v průběhu 24 hodin (od 00:00 do 24:00). Délka spánku pro skupinu pacientů a kontrol je znázorněna na Grafu 3 jako průměr  $\pm$  SEM.

Záznamy spánkových kalendářů ukázaly, že spánek pacientů s AN byl oproti spánku kontrolních zdravých seniorů prokazatelně delší ( $P=0,005$ ).



Graf 3. Průměrná délka spánku pacientů s AN a kontrolních zdravých seniorů získaná ze spánkových kalendářů. Osa y označuje délku trvání v hodinách.

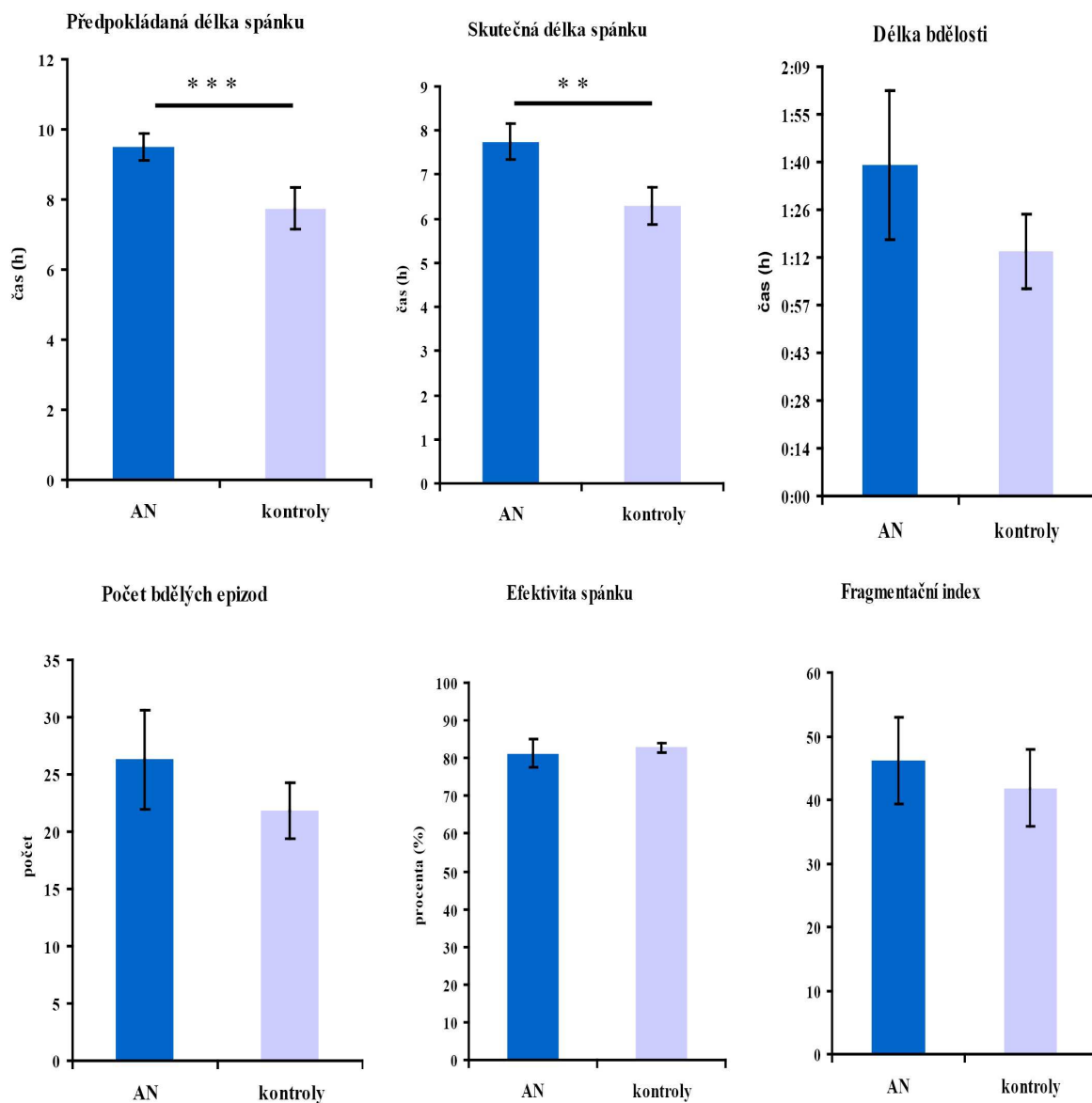
#### 6.1.4. Spánková analýza

Analýza spánku byla provedena s využitím softwaru Activity & Sleep Analysis V 5.42 ze záznamů získaných z Actiwatch od 6 pacientů a 4 kontrolních zdravých seniorů (viz kap. 5.4.2.). Sledovali jsme spánkové parametry vypovídající o kvalitě a struktuře spánku. Jednotlivé sledované parametry jsou popsány v kapitole 5.4.2. . Ze získaných hodnot jednotlivých parametrů byl vypočítán aritmetický průměr a SEM (Tab. 2 a Graf 4).

Statistické srovnání hodnot mezi oběma skupinami pomocí t-testu prokázalo signifikantní rozdíl v parametrech sledujících předpokládanou délku spánku ( $P=0,002$ ) a skutečnou délku spánku ( $P=0,014$ ). U ostatních parametrů nebyl t-testem zjištěn statisticky významný rozdíl (Tab. 2).

Parametry spánku			
	AN	Kontroly	P- hodnota t -testu
	(průměr $\pm$ SEM)	(průměr $\pm$ SEM)	
čas usnutí; h:mm (h),	22:15 $\pm$ 0:20	23:19 $\pm$ 0:51	
čas probuzení; h:mm (h)	8:07 $\pm$ 0:19	7:17 $\pm$ 0:56	
Předpokládaná délka spánku; h:mm (h)	9:27 $\pm$ 0:22	7:47 $\pm$ 0:35	0,002 (**)
Skutečná délka spánku; h:mm (h)	7:48 $\pm$ 0:25	6:33 $\pm$ 0:25	0,014 (*)
Procenta skutečného spánku (%)	82,82 $\pm$ 3,59	84,73 $\pm$ 1,35	0,69
Délka bdělosti; h:mm (h)	1:39 $\pm$ 0:22	1:13 $\pm$ 0,11	0,394
Procenta bdělosti (%)	17,18 $\pm$ 3,59	15,27 $\pm$ 1,35	0,69
Efektivita spánku	81,28 $\pm$ 3,70	82,86 $\pm$ 1,19	0,746
Počet bdělých epizod	26,29 $\pm$ 4,33	21,85 $\pm$ 2,45	0,464
Fragmentační index	46,07 $\pm$ 6,81	41,78 $\pm$ 6,03	0,672

Tab. 2 Jednotlivé sledované parametry spánku pacientů s AN a kontrolních zdravých seniorů vyjádřené průměrnou hodnotou a SEM. Hodnoty obou skupin jsou srovnané t-testem a statistický rozdíl je vyjádřen pomocí P-hodnoty.

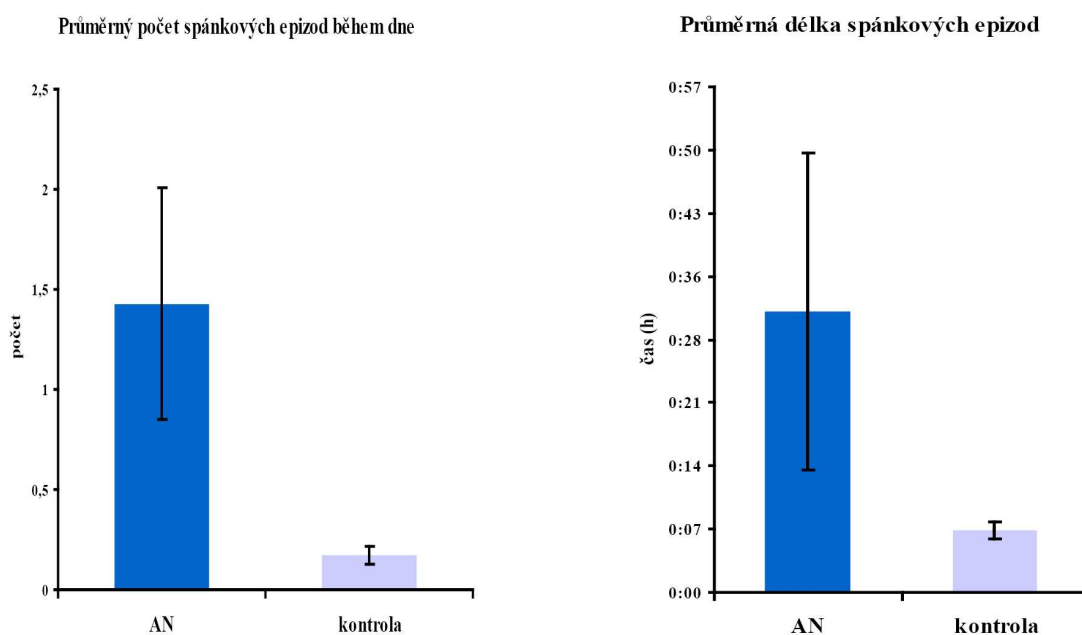


*Graf 4. Grafické srovnání jednotlivých spánkových parametrů pacientů s AN s kontrolními zdravými seniory shrnuté v Tabulce č. 2.*



### 6.1.5. Analýza denního podřimnutí „nap analysis“

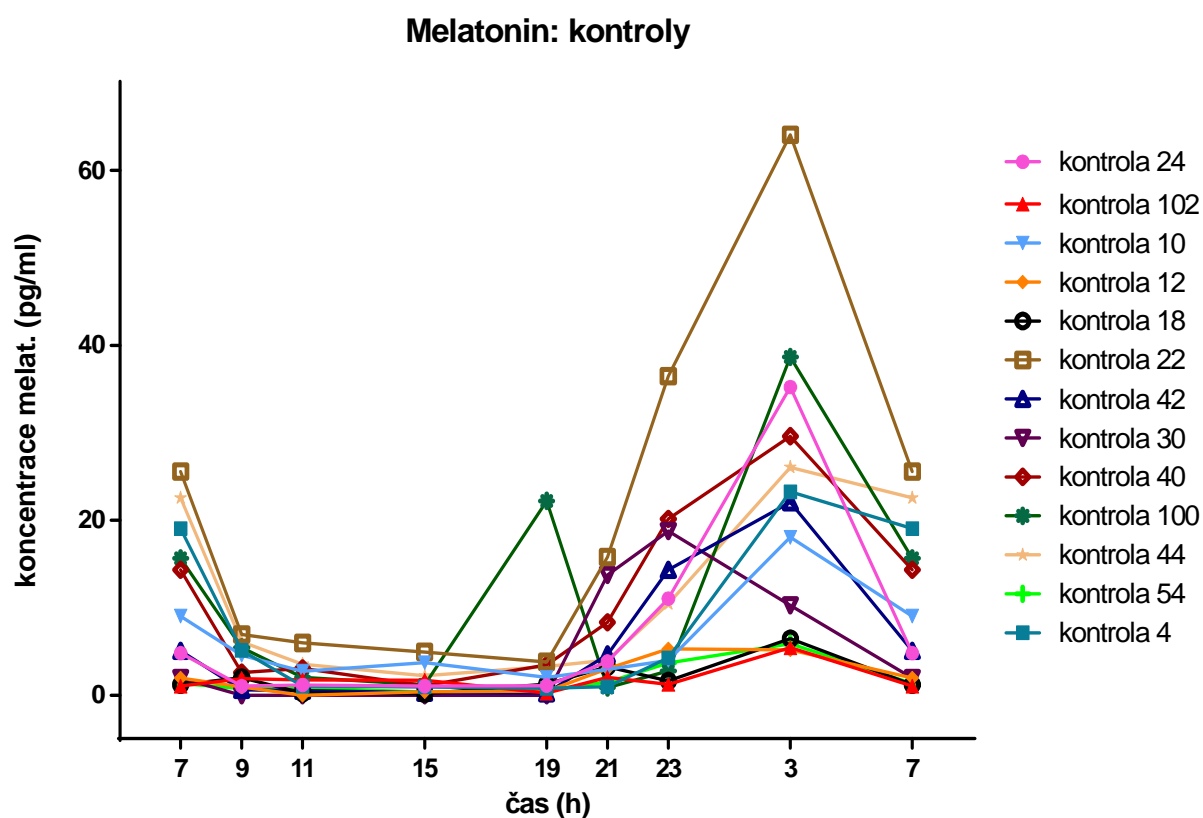
Analýza denního podřimnutí byla provedena s využitím softwaru Activity & Sleep Analysis V 5.42 ze záznamů získaných z Actiwatch a spánkových kalendářů od 5 pacientů a 4 kontrolních zdravých seniorů (viz kapitola 5.4.2.). Jeden pacient byl z analýzy vyloučen, protože záznamy uvedené ve spánkovém kalendáři vykazovaly výrazné odlišnosti v porovnání s výsledky nap analýzy provedené softwarem. Sledovali jsme počet spánkových epizod během dne a jejich průměrnou délku u pacientů s AN a u kontrolních zdravých seniorů. Ze získaných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a SEM. Výsledek t-testu ukázal, že průměrný počet spánkových epizod u AN a u kontrolních zdravých seniorů se nijak významně statisticky neliší ( $P = 0,120$ ), stejně tak nebyl prokázán ani rozdíl v průměrné délce spánkových epizod ( $P = 0,299$ ) (Graf 5). Nicméně i tento statisticky nevýznamný rozdíl mezi skupinami naznačuje, že u pacientů s AN je výskyt denních spánkových epizod častější, mají tedy tendenci během dne více pospávat.



Graf 5. Srovnání sledovaných parametrů denního podřimnutí pacientů s AN s kontrolními zdravými seniory.

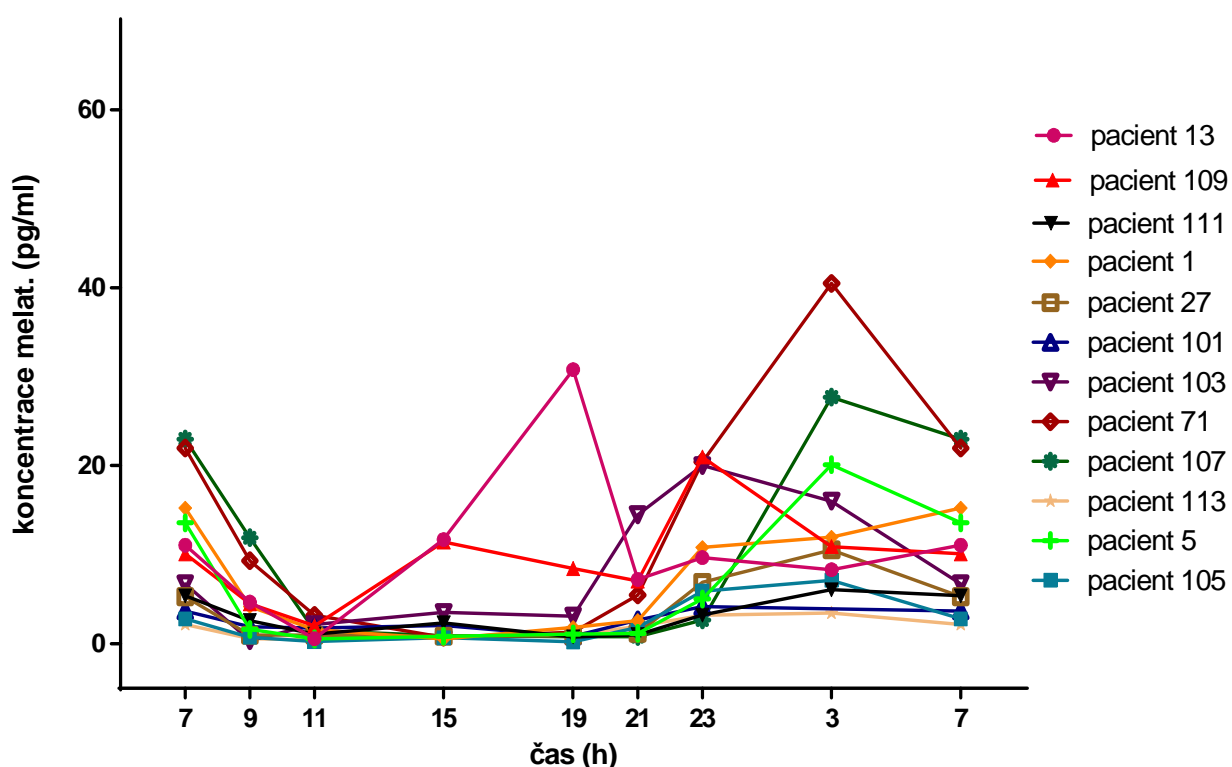
## 6.2. Denní profily hladin melatoninu

Denní profily v hladinách melatoninu byly sledovány pomocí jejich stanovení v 9 časových bodech během 24 hodin. Individuální profily pro kontrolní subjekty jsou ukázány v Grafu 6 a pro pacienty v Grafu 7. Barva každé křivky v Grafu 6 a Grafu 7 odpovídá dvojici pacient-pečovatel žijící ve stejné domácnosti. Pohlaví a věk jednotlivců dokládá Tab. 3. Výsledné denní profily byly dále analyzovány za účelem zjištění přítomnosti, fáze a amplitudy rytmu.



*Graf 6. Individuální profily hladin melatoninu ve slinách zdravých seniorů v průběhu 24 hodin. Na ose x je vyneseno čas v hodinách, osa y označuje koncentraci melatoninu v pg/ml. Jednotlivé křivky znázorňují průběh tvorby melatoninu pro každého jedince zvlášť. Každý bod znázorňuje 1 odběr v konkrétním čase.*

### Melatonin: AN

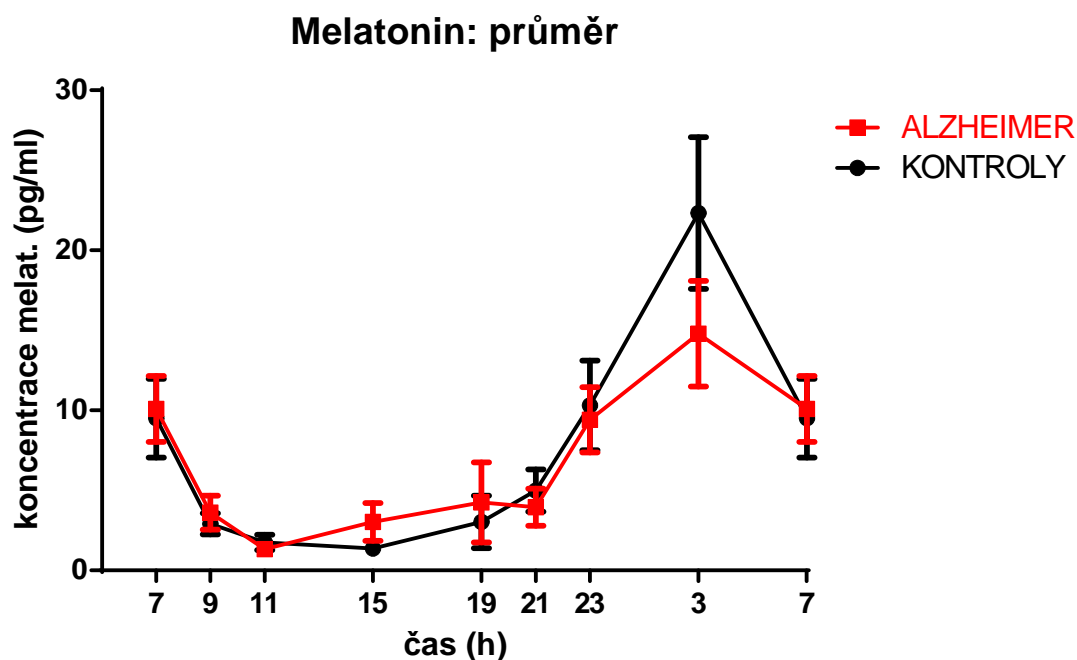


Graf 7. Individuální profily hladin melatoninu ve slinách pacientů s AN v průběhu 24 hodin. Na ose x je vyneseno čas v hodinách, osa y označuje koncentraci melatoninu v pg/ml. Jednotlivé křivky znázorňují změny hladiny melatoninu v průběhu dne pro každého jedince zvlášť. Každý bod znázorňuje 1 odběr v konkrétním čase.

Tab.3. Seznam účastníků studie. Barevné označení dvojic odpovídá barvě jednotlivých křivek v grafu (Graf 6 a Graf 7), a zároveň stejná barva vždy označuje partnery žijící ve stejné domácnosti. Tabulka uvádí i pohlaví a věk účastníka.

	pohlaví	věk
kontrola 24	muž	73
pacient 13	žena	72
kontrola 102	muž	87
pacient 109	žena	83
kontrola 10	muž	81
pacient 111	žena	78
kontrola 12	muž	83
pacient 1	žena	88
kontrola 18	žena	77
pacient 25	muž	79
kontrola 22	muž	80
pacient 27	žena	76
kontrola 42	muž	63
pacient 101	žena	63
kontrola 30	žena	77
pacient 103	muž	82
kontrola 40	muž	88
pacient 71	žena	82
kontrola 44	žena	81
pacient 113	muž	87
kontrola 54	žena	71
pacient 105	muž	77
kontrola 4	žena	80
pacient 5	muž	80
kontrola 100	žena	74
pacient 107	muž	79





Graf 8. Průměrné hodnoty ( $\pm$  SEM) hladin melatoninu pro skupinu pacientů s AN (červeně) a kontrolních zdravých seniorů (černě). Na ose x je vynesena čas v hodinách, na ose y koncentrace melatoninu v pg/ml.

Průměrné denní profily hladin melatoninu pro skupinu kontrol a pacientů jsou ukázány v Grafu 8. Profily byly srovnávány pomocí dvojné ANOVA. Výsledky prokázaly významný efekt času ( $P < 0,001$ ). Ačkoliv byl pozorován trend k nižším hladinám melatoninu u AN pacientů v nočních hodinách, statisticky významný rozdíl mezi skupinami nebyl potvrzen. Výsledek tak neprokázal, že u pacientů s AN dochází k statisticky významnému narušení hladin melatoninu.

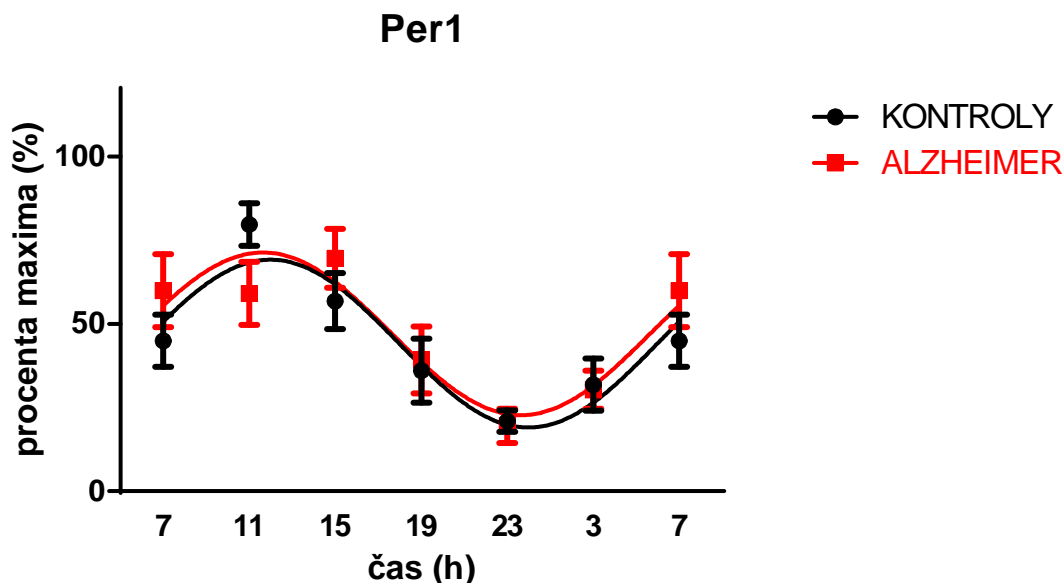
### 6.3. Profily exprese hodinových genů

V získaných vzorcích bukových stěrů jsme sledovali denní profily exprese hodinových genů. Zaměřili jsme se na rytmus dvou hodinových genů, *Per1* a *Bmal1*, které jsou exprimované vzájemně v protifázi (viz. kap. 3.3.). Sledovali jsme přítomnost rytmu, jejich amplitudu a akrofázi. Následně jsme porovnávali fáze těchto rytmů u pacientů s AN a kontrolní skupiny.

#### 6.3.1. Denní profil exprese hodinového genu *Per1*

Denní profily exprese hodinového genu *Per1* u kontrolních subjektů a pacientů jsou znázorněny v Grafu 9. Cosinorová analýza prokázala vysoce signifikantní rytmus *Per1* exprese u kontrolních zdravých seniorů ( $P < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,2831$ ) i u pacientů s AN ( $P < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,2213$ ). Hodnoty amplitudy exprese *Per1* vypočítané cosinorovou analýzou se u pacientů s AN ( $25,1 \pm 4,29$ ) a kontrolních zdravých seniorů ( $24,3 \pm 5,08$ ) nelišila. Pacienti s AN dosáhli akrofáze v  $11,64 \pm 0,73$  h a kontrolní zdraví senioři v  $11,98 \pm 0,59$  h. Statistickým srovnáním pomocí Akaikeho informačních kritérií (AIC) nebyl prokázán rozdíl mezi fázemi rytmů v expresi *Per1* u obou skupin (AIC = -2,162).

Stejně tak porovnání denních profilů exprese *Per1* mezi oběma skupinami pomocí dvojné ANOVA prokázalo statisticky významný vliv času ( $P < 0,0001$ ), ale neprokázalo statisticky významný rozdíl mezi profily obou skupin ( $P = 0,4714$ ).

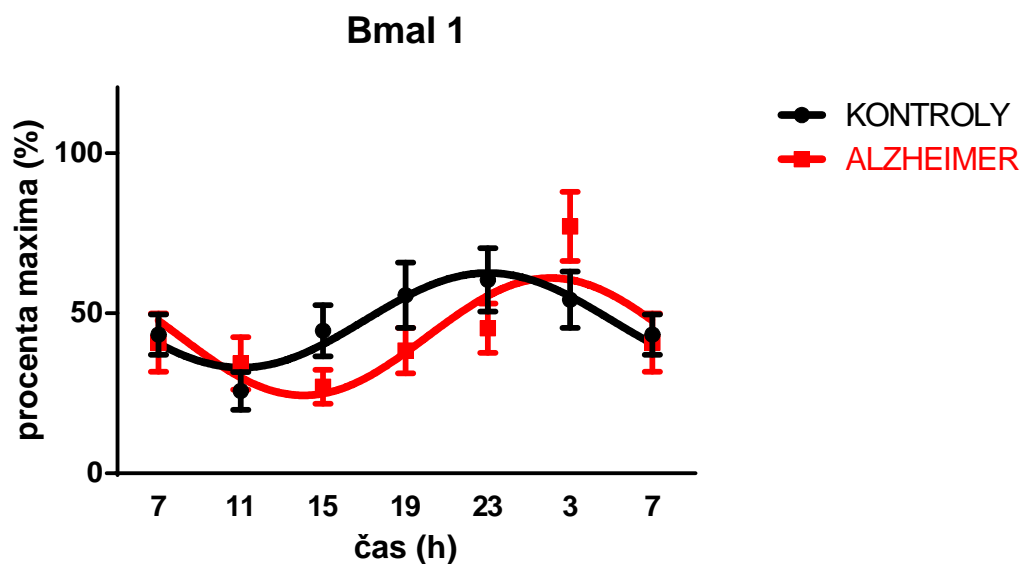


Graf 9. Denní profily hladin *Per1* mRNA u pacientů s AN (červeně) a u kontrolních zdravých seniorů (černě). Jednotlivými časovými body je proložena sinusová křivka a provedena cosinorová analýza. Na ose x je vynesena čas a na ose y procenta maxima. Časové body označují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM.

### 6.3.2. Denní profil exprese hodinového genu *Bmal1*

Denní profily exprese hodinového genu *Bmal1* u kontrolních subjektů a pacientů jsou znázorněny v Grafu 10. Cosinorová analýza prokázala vysoce signifikantní rytmus exprese hodinového genu *Bmal1* u kontrolních zdravých seniorů ( $P=0,0058$ ,  $R^2 = 0,1105$ ) i u pacientů s AN ( $P = 0,0015$ ,  $R^2 = 0,149$ ). Amplituda rytmické exprese *Bmal1* byla u skupiny pacientů s AN  $18,44 \pm 4,45$  a kontrolní skupiny zdravých seniorů  $14,77 \pm 4,88$ . Akrofáze u pacientů s AN nastala v  $2,06 \pm 0,91$  h, zatímco u kontrolních zdravých seniorů již v  $23,03 \pm 1,09$  h. Analýza pomocí AIC prokázala rozdíl mezi fázemi u obou skupin ( $AIC= 0,2734$ ).

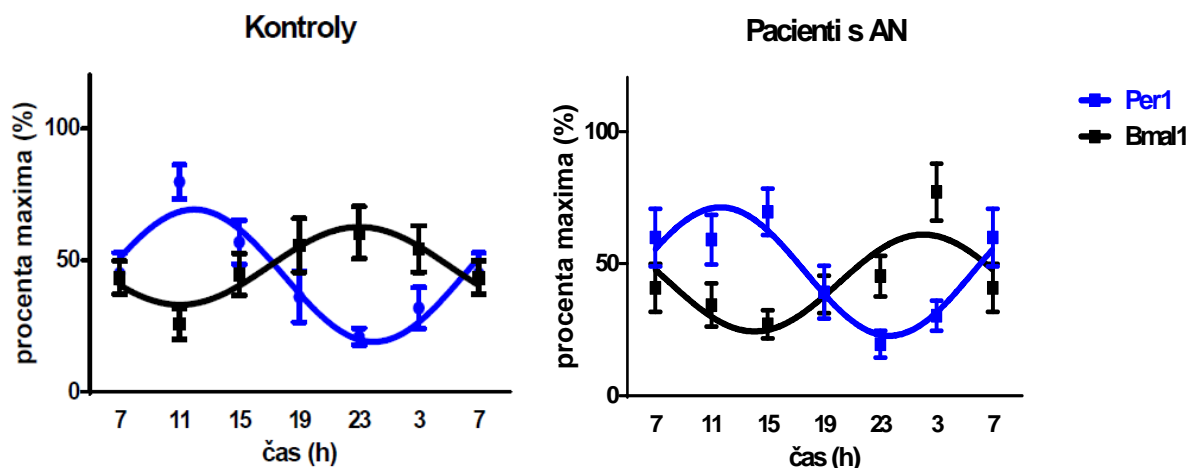
Porovnání profilů exprese *Bmal1* hodinového genu mezi oběma skupinami pomocí dvojné ANOVA prokázalo statisticky významný vliv času ( $P=0,0003$ ), avšak rozdíl mezi skupinami statisticky prokázán nebyl ( $P=0,2116$ ).



*Graf 10. Denní profily hladin Bmal1 mRNA u pacientů s AN (červeně) a u kontrolních zdravých seniorů (černě). Jednotlivými časovými body je proložena sinusová křivka a provedena cosinorová analýza. Na ose x je vynesena čas a na ose y procenta maxima. Časové body označují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM.*

### 6.3.3. Srovnání vzájemné fáze denních profilů exprese *Per1* a *Bmal1*

Srovnání profilů exprese hodinového genu *Per1* a *Bmal1* u pacientů s AN a kontrolních zdravých seniorů naznačilo, že vzájemná fáze rytmických profilů exprese obou hodinových genů se u kontrol a pacientů může lišit. Zatímco u kontrolní skupiny byl rozdíl mezi fázemi obou rytmů 11,05 h, u pacientů byl 14,42 h (Graf 11.).



Graf 11. Znázornění protifáze denní exprese hodinových genů *Bmal1* (černě) a *Per1* (modře) u kontrolních zdravých seniorů a u pacientů s AN. Jednotlivými časovými body je proložena sinusová křivka a provedena cosinorová analýza. Na ose x je vynesena čas a na ose y procenta maxima. Časové body označují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM.

Z výsledků získaných při porovnání denních profilů exprese hodinových genů vyplývá, že molekulární mechanismus cirkadiánních rytmů na periférii u pacientů s AN není narušen ani výrazně změněn. Hodinové geny *Per1* a *Bmal1* vykazují rytmické oscilace a zmíněné geny jsou exprimované ve vzájemné protifázi, což poukazuje na funkční zpětnovazebnou transkripčně translační smyčku (viz kap.3.3). Výsledky pouze naznačily posun ve fázi rytmu v expresi *Bmal1* u pacientů s AN ve srovnání s kontrolními subjekty, tento posun však byl prokázán pouze jedním z použitých statistických testů.

## 7. DISKUSE

Výsledky této práce prokazují nebo naznačují změny některých parametrů sledujících pohybovou aktivitu a spánek u pacientů s AN ve srovnání s kontrolními zdravými subjekty. Na úrovni endogenních ukazatelů funkčního stavu cirkadiánního systému, tj. denních rytmtů v hladinách melatoninu a expresi hodinových genů, nebyly potvrzeny žádné signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami. Výsledky tak naznačují, že AN sice ovlivňuje spánkový režim pacientů, ovšem funkci jejich vnitřních cirkadiánních hodin pravděpodobně významně nenarušuje.

### **Stav cirkadiánního systému u pacientů s AN na behaviorální úrovni a úrovni spánku**

Rytmus pohybové aktivity je nejzřetelnějším výstupním rytmem cirkadiánních hodin. Změna jeho rytmu nebo defragmentace pohybové aktivity během dne je považovaná za první indikátor narušení cirkadiánního systému. Výsledky srovnávající celkovou aktivitu u pacientů s AN a kontrol neprokázaly žádný signifikantní rozdíl. Obě skupiny vykazovaly podobnou průměrnou aktivitu během dne. V ranních hodinách byl ovšem u pacientů s AN naznačen výraznější pokles aktivity. Řada prací dokládá snížení aktivity u pacientů s AN vůči kontrolní skupině (Ghali et al., 1995; van Someren et al., 1996; Witting et al., 1990). Ovšem při srovnání aktivity pacientů s AN, kteří byli buď hospitalizováni nebo byli v domácí péči, se zdravou kontrolní skupinou se ukázalo, že pohybová aktivita pacientů žijících v domácím prostředí je vůči kontrolní skupině změněna minimálně, zatímco u hospitalizovaných pacientů byla celková aktivita snížena a byla narušena stabilita rytmu pohybové aktivity mezi jednotlivými dny (van Someren et al., 1996). Narušení pohybové aktivity se výrazněji projevuje až ve vyšších stádiích AN, u pacientů v domácí péči představuje toto narušení dlouhodobý proces a může k němu docházet i v řádu let (Hatfield et al., 2004).

Parametry, které sledovala spánková analýza, prokázaly statisticky významný rozdíl pouze ve srovnání délky spánku mezi skupinami. U pacientů s AN bylo zaznamenáno signifikantní prodloužení doby spánku. V efektivitě spánku, fragmentačním indexu, počtu bdělých epizod ani v procentuálním zastoupení spánku a bdělosti během noci nebyl signifikantní rozdíl zaznamenán. Méně významné narušení spánku v domácím prostředí prokázala i práce autorů Pollaka a Stokese (Pollak and Stokes, 1997). Přesnější analýza spánku pomocí polysomnografických studií u pacientů s AN ovšem ukázala, že u nich dochází k výrazným

změnám spánkové architektury především na úrovni úbytku REM spánku a 3. - 4. stádia NREM spánku (Vitiello et al., 1990). Tato změna je současně považována za jednu z příčin zhoršování konsolidace paměťové stopy (Hobson and Pace-Schott, 2002). K úbytku REM spánku dochází i u mírné formy AN (Bonanni et al., 2005). V tomto ohledu je námi provedené sledování pacientů pouze pomocí aktigrafů limitující, jelikož střídání REM a NREM fáze spánku nelze pomocí této metody zaznamenat.

Analýzou denního podřimnutí jsme sledovali délku a počet podřimnutí během dne. Výsledky této analýzy neprokázaly rozdíly mezi pacienty a kontrolní skupinou, byl ale naznačen trend ke zvýšení výskytu denních spánkových epizod u pacientů s AN. Zvýšený výskyt podřimování během dne už od mírných forem AN potvrzuje řada studií (Bonanni et al., 2005; Lee et al., 2007). Skutečnost, že naše výsledky nepotvrdily statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami, mohla být zapříčiněna variabilitou v rámci každé skupiny, věkem pacientů a relativně nízkým počtem účastníků studie.

#### **Stav cirkadiánního systému u pacientů s AN sledovaný pomocí endogenních ukazatelů**

Epifýza je anatomicky a funkčně propojená s SCN a hladiny melatoninu v tělních tekutinách jsou tak přímo závislé na funkčním stavu SCN. Výsledky experimentu sledující denní profily hladin melatoninu neprokázaly statisticky významné rozdíly mezi skupinami pacientů s AN a zdravými kontrolami. Denní rytmus v hladinách melatoninu vykazoval typický noční nárůst jak u kontrolních zdravých seniorů, tak i u pacientů s AN. Noční hladiny nebyly u pacientů s AN vůči kontrolní skupině statisticky významně snižené, i když toto snížení bylo naznačené. Trend snižování hladiny melatoninu je v literatuře často popisován v souvislosti se stárnutím. Tyto práce sice sledují hladiny melatoninu u různých věkových skupin, ale velmi zanedbávají kontrolu světelného režimu (Zhao et al., 2002; Zhou et al., 2003b). Práce Zeitzera et al. trend snižování melatoninu během stárnutí zcela vyvrací. Jako jediná sleduje subjekty v plně kontrolovaných podmínkách s využitím protokolu konstantní rutiny, který umožňuje sledovat cirkadiánní rytmy bez ovlivňování faktory vnějšího prostředí. V takovýchto podmínkách nebylo snížení melatoninu téměř patrné (Zeitzer et al., 1999). Řada prací toto snižování s využitím různých metodických přístupů popisuje i u AN. Ovšem výrazně signifikantní rozdíl v hladinách melatoninu popisují pouze práce stanovující hladiny melatoninu z cerebrospinální tekutiny získané post mortem. Už v raných stádiích AN popisují snížení hladiny melatoninu na jednu pětinu v porovnání s kontrolní skupinou (Liu et al., 1999; Wu et al., 2003; Zhou et al., 2003a). Takovéto studie jsou však v mnoha ohledech limitující,

protože k rozdělení do skupin vykazujících ranní a denní hladiny melatoninu se využívá čas úmrtí. Takto je do dvou skupin shrnuta široká škála různých denních hladin melatoninu a údaj o čase úmrtí navíc nemusí být pro rozdělení do skupin vždy spolehlivý. Kromě toho u pacientů v těchto studiích není známa předchozí světelná historie, která významně ovlivňuje hladiny melatoninu (viz kap. 3.4.2). Hladiny melatoninu mohou být dále ovlivněny i posmrtnými změnami; molekula melatoninu je fotolabilní, a proto může být jeho koncentrace ovlivněna i manipulací s tkání na světle. Snížené hladiny melatoninu u pacientů s AN popisují i práce srovnávající hladiny melatoninu měřené v plazmě, ovšem rozdíly oproti kontrolním skupinám nejsou tak výrazné (Ferrari et al., 2000; Mishima et al., 1999; Ohashi et al., 1999)

Z výsledků sledujících profily exprese hodinových genů *Per1* a *Bmal1* vyplynulo, že molekulární mechanismus cirkadiánních rytmů na periférii nebyl u pacientů s AN výrazně pozměněn. Exprese hodinového genu *Per1* vykazovala cirkadiánní rytmus u pacientů s AN i u kontrolních zdravých seniorů s téměř shodnou amplitudou a fází. Podobně byla prokázána u obou skupin i rytmická exprese genu *Bmal1*. Na rozdíl od genu *Per1* byla u pacientů s AN pro *Bmal1* naměřena větší amplituda a fázový posun rytmu. Rytmické exprese hodinových genů *Bmal1* a *Per1* probíhaly vzájemně v opačné fázi, což potvrzuje funkční stav endogenních cirkadiánních hodin jak u pacientů, tak u kontrol (viz kap. 3.3.). V dostupné literatuře dosud není o expresi hodinových genů u pacientů s AN publikováno mnoho údajů. Existující studie, které se zabývaly expresí hodinových genů u pacientů s AN, byly u lidí prováděny pouze posmrtně (Wu et al., 2006). Expresi hodinových genů sledovaly v některých vybraných strukturách mozku. Sledování denního profilu exprese hodinových genů v periferních tkáních (v tomto případě v buňkách bukalní sliznice) u živých pacientů bylo v této práci popsáno zcela nově.

### **Metodický postup sledování cirkadiánního systému v přirozených podmínkách**

Metodický přístup, který byl pro tuto práci zvolen, se zaměřoval na sledování cirkadiánního systému pacientů v přirozených podmínkách, tj. v domácím prostředí. Takto navržený experiment lépe reflektuje schopnost reakce cirkadiánního systému na vlivy vnějšího prostředí. Experimenty zaměřené na studium endogenního stavu cirkadiánního systému vyžadují používání protokolu, při kterém jsou vlivy vnějšího prostředí odstraněny, tj. buď protokolu tzv. konstantní rutiny, nebo nucené desynchronizace. Tyto experimenty je možné provádět pouze ve specializovaných spánkových laboratořích, kde jsou sledované osoby v průběhu studie ubytovány a kde je možné nastavit uměle kontrolovaný světelný režim.



V námi zvoleném typu experimentu, který umožňuje odhalit přirozený stav cirkadiálního systému, je jedinec sledován v průběhu svého každodenního života včetně vlivu okolního prostředí. Tento postup umožňuje sledování schopnosti cirkadiálního systému reagovat právě na tyto vnější vlivy, včetně sociálních faktorů, se kterými se jedinec musí denně vypořádávat. S ohledem na uspořádání této studie byli účastníci i vybíráni. Jednalo se o ambulantně léčené pacienty s AN schopné žít v domácím prostředí pod dohledem pečující osoby, kterou byl jejich partner. Pečovatel, žijící ve velmi podobných světelných podmínkách jako pacient, zároveň poskytoval ideální kontrolu. Jednotlivé páry pacient/pečovatel byly požádány, aby se několik dní před odběry chovaly přirozeně, především aby oba dodržovaly své přirozené denní zvyklosti související s aktivitou a jejím načasováním. Jelikož si vzorky odebírali samostatně v domácím prostředí, bylo nutné je velmi dobře proškolit, jak odběry provádět a jak vzorky uchovávat. Největším rizikem této studie bylo zajištění světelných podmínek během odběrů, konkrétně nízké intenzity světla během nočních odběrů vzorků, kdy je cirkadiální systém i odebrané vzorky na osvit nejcitlivější.

Zdá se, že co se týče udržení rytmu denní aktivity, domácí péče pacientům s AN výrazně prospívá. Režim spánku není nemocí výrazně postižen. Nelze však vyloučit, že je u nich postižena vnitřní struktura spánku, která se na behaviorální úrovni může projevovat jen minimálně. Zhoršená kvalita spánku, především úbytek 3. - 4. fáze NREM pak může vést k častějšímu dennímu pospávání. Na základě našich výsledků se tedy nedá jednoznačně tvrdit, že rytmus spánku a bdění je u našich pacientů narušen vlivem snížené funkce cirkadiálního systému. Rytmus pohybové aktivity a rytmus spánku a bdění, potenciálně i tedy cirkadiální systém, však může ovlivňovat dlouhodobá hospitalizace (Vinzio et al., 2003). V tomto prostředí může docházet ke sníženému působení synchronizačních stimulů, jelikož pacienti tráví více času na lůžku a bývají méně vystavováni slunečnímu světlu. Práce popisující narušení cirkadiálního systému u hospitalizovaných pacientů s AN tak zřejmě spíše prezentují jeho narušení vlivem nedostatku synchronizačních stimulů. Zdá se, že v domácím prostředí je cirkadiální systém téměř plně funkční. To dokládá i druhá část výsledků naší práce, sledující endogenní ukazatele funkce cirkadiálních hodin. Během dne se u našich pacientů melatonin tvořil rytmicky a hodinové geny též pravidelně oscilovaly v čase. Zároveň jsme funkční stav molekulárního mechanismu endogenních cirkadiálních rytmů potvrdili přímým sledováním denních profilů exprese hodinových genů *Per 1* a *Bmal1*, které byly exprimovány ve vzájemné protifázi.

## 8. ZÁVĚR

Tato práce ukázala, že u ambulantně léčených pacientů s AN není cirkadiánní systém výrazně narušen, pokud jsou sledováni v podmínkách svého domova. U pacientů byl prokázán rozdíl v denním profilu pohybové aktivity ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto změny však nebyly doprovázeny výraznými změnami funkčního stavu cirkadiánního systému na úrovni endogenních ukazatelů funkce cirkadiánního systému, prezentovaných denními hladinami melatoninu a mRNA hodinových genů.

Použití postupů vedoucích ke stabilizaci cirkadiánních rytmů, jako je využívání účinků fototerapie (léčby světlem) nebo podávání chronobiotik, je pro terapii AN stále diskutabilní. Pokud u pacienta dojde k narušení spánkového rytmu, může chronoterapie pozitivně ovlivnit průběh nemoci (Asayama et al., 2003). Nedávné práce však poukazují na pouze zanedbatelný efekt léčby využívající fototerapii u pacientů s AN (Forbes et al., 2014). Některé typicky se vyskytující projevy AN, jako tzv. „sundowning syndrom“, je však možné chronoterapií výrazně omezit (Cohen-Mansfield et al., 2000). Léčba vedoucí ke stabilizaci cirkadiánních rytmů a zkvalitnění spánku může nejen zvýšit kvalitu života nemocného, ale zároveň usnadnit i náročnou domácí či ambulantní péči o něj (Van Someren et al., 1997). Využívání chronoterapie poruch spánku v některých případech může vést ke stabilizaci spánkového rytmu, aniž je narušen fyziologický průběh spánku, který se naopak zlepšuje.

Zůstává také stále otázkou, zda zlepšení cirkadiánních rytmů u pacientů s AN může pozitivně ovlivnit průběh nemoci a zmírnit její projevy, od kognitivních po spánkové poruchy. Důkazy potvrzující nebo vyvracející přímý dopad AN na cirkadiánní systém nejsou dosud k dispozici v dostatečném množství. Vzhledem k epidemiologickým předpovědím šíření této nemoci by bylo vhodné podobné studie rozšířit o pacienty v pokročilých stádiích AN a provést výzkum ve větším měřítku.

### **Seznam literatury:**

- Abe, M., E. D. Herzog, S. Yamazaki, M. Straume, H. Tei, Y. Sakaki, M. Menaker, and G. D. Block, 2002, Circadian rhythms in isolated brain regions: *The Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 350-356.
- Abrahamson, E. E., and R. Y. Moore, 2001, The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections: *Brain Res*, v. 889, p. 1-22.
- Achermann, P., and A. A. Borbely, 2003, Mathematical models of sleep regulation: *Front Biosci*, v. 8, p. s683-93.
- Alam, M. N., S. Kumar, T. Bashir, N. Suntsova, M. M. Methippara, R. Szymusiak, and D. McGinty, 2005, GABA-mediated control of hypocretin-but not melanin-concentrating hormone-immunoreactive neurones during sleep in rats: *The Journal of physiology*, v. 563, p. 569-582.
- Alarma-Estrany, P., and J. Pintor, 2007, Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology: *Pharmacology & therapeutics*, v. 113, p. 507-522.
- Albus, H., M. Vansteensel, S. Michel, G. Block, and J. Meijer, 2005, A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock: *Current Biology*, v. 15, p. 886-893.
- Anderson, K. N., and A. J. Bradley, 2013, Sleep disturbance in mental health problems and neurodegenerative disease: *Nat Sci Sleep*, v. 5, p. 61-75.
- Arendt, J., D. J. Skene, B. Middleton, S. W. Lockley, and S. Deacon, 1997, Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness: *Journal of biological rhythms*, v. 12, p. 604-617.
- Asayama, K., H. Yamadera, T. Ito, H. Suzuki, Y. Kudo, and S. Endo, 2003, Double blind study of melatonin effects on the sleep-wake rhythm, cognitive and non-cognitive functions in Alzheimer type dementia: *J Nippon Med Sch*, v. 70, p. 334-41.
- Balzer, I., and R. Hardeland, 1988, Influence of temperature on biological rhythms: *International journal of biometeorology*, v. 32, p. 231-241.
- Bliwise, D. L., 2005, Chapter 3 - Normal Aging, *in* M. H. Kryger, T. Roth, and W. C. Dement, eds., *Principles and Practice of Sleep Medicine (Fourth Edition)*: Philadelphia, W.B. Saunders, p. 24-38.

- Bojkowski, C., and J. Arendt, 1990, Factors influencing urinary 6-sulphatoxymelatonin, a major melatonin metabolite, in normal human subjects *Clinical endocrinology*, v. 33, p. 435-444.
- Bonanni, E., M. Maestri, G. Tognoni, M. Fabbrini, B. Nucciarone, M. L. Manca, S. Gori, A. Iudice, and L. Murri, 2005, Daytime sleepiness in mild and moderate Alzheimer's disease and its relationship with cognitive impairment: *Journal of sleep research*, v. 14, p. 311-317.
- Bunney, J. N., and S. G. Potkin, 2008, Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression: *British medical bulletin*, v. 86, p. 23-32.
- Carrier, J., J. Paquet, J. Morettini, and E. Touchette, 2002, Phase advance of sleep and temperature circadian rhythms in the middle years of life in humans: *Neurosci Lett*, v. 320, p. 1-4.
- Carskadon, M. A., and W. C. Dement, 2000, Normal human sleep: an overview: *Principles and practice of sleep medicine*, v. 4, p. 13-23.
- Cermakian, N., E. Waddington Lamont, P. Boudreau, and D. B. Boivin, 2011, Circadian Clock Gene Expression in Brain Regions of Alzheimer 's Disease Patients and Control Subjects: *Journal of Biological Rhythms*, v. 26, p. 160-170.
- Chen, D., G. Buchanan, J. Ding, J. Hannibal, and M. Gillette, 1999, Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: A pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 13468-13473.
- Chou, T. C., T. E. Scammell, J. J. Gooley, S. E. Gaus, C. B. Saper, and J. Lu, 2003, Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms: *The Journal of Neuroscience*, v. 23, p. 10691-10702.
- Cohen-Mansfield, J., D. Garfinkel, and S. Lipson, 2000, Melatonin for treatment of sundowning in elderly persons with dementia - a preliminary study: *Arch Gerontol Geriatr*, v. 31, p. 65-76.
- Conti, A., S. Conconi, E. Hertens, K. Skwarlo-Sonta, M. Markowska, and G. J. Maestroni, 2000, Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells: *Journal of pineal research*, v. 28, p. 193-202.
- Coyle, J. T., D. L. Price, and M. R. DeLong, 1983, Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation: *Science*, v. 219, p. 1184-90.
- Dijk, D.-J., and C. A. Czeisler, 1995, Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves,

- and sleep spindle activity in humans: *The Journal of neuroscience*, v. 15, p. 3526-3538.
- Ding, J. M., L. E. Faiman, W. J. Hurst, L. R. Kuriashkina, and M. U. Gillette, 1997, Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide: *The Journal of neuroscience*, v. 17, p. 667-675.
- Dowling, G. A., R. L. Burr, E. J. Van Someren, E. M. Hubbard, J. S. Luxenberg, J. Mastick, and B. A. Cooper, 2008, Melatonin and bright-light treatment for rest-activity disruption in institutionalized patients with Alzheimer's disease: *J Am Geriatr Soc*, v. 56, p. 239-46.
- Duffy, J. F., J. M. Zeitzer, D. W. Rimmer, E. B. Klerman, D. J. Dijk, and C. A. Czeisler, 2002, Peak of circadian melatonin rhythm occurs later within the sleep of older subjects: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 282, p. E297-303.
- Estabrooke, I. V., M. T. McCarthy, E. Ko, T. C. Chou, R. M. Chemelli, M. Yanagisawa, C. B. Saper, and T. E. Scammell, 2001, Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state: *The Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 1656-1662.
- Ferrari, E., A. Arcaini, R. Gornati, L. Pelanconi, L. Cravello, M. Fioravanti, S. Solerte, and F. Magri, 2000, Pineal and pituitary-adrenocortical function in physiological aging and in senile dementia: *Experimental gerontology*, v. 35, p. 1239-1250.
- Foley, D. J., A. A. Monjan, S. L. Brown, E. M. Simonsick, R. B. Wallace, and D. G. Blazer, 1995, Sleep complaints among elderly persons: an epidemiologic study of three communities: *Sleep*, v. 18, p. 425-32.
- Forbes, D., C. M. Blake, E. J. Thiessen, S. Peacock, and P. Hawranik, 2014, Light therapy for improving cognition, activities of daily living, sleep, challenging behaviour, and psychiatric disturbances in dementia: *Cochrane Database Syst Rev*, v. 2, p. Cd003946.
- Fuller, P. M., J. J. Gooley, and C. B. Saper, 2006, Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback: *J Biol Rhythms*, v. 21, p. 482-93.
- Garcia-Mesa, Y., L. Gimenez-Llort, L. C. Lopez, C. Venegas, R. Cristofol, G. Escames, D. Acuna-Castroviejo, and C. Sanfeliu, 2012, Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse: *Neurobiol Aging*, v. 33, p. 1124.e13-29.
- Gehrman, P. R., D. J. Connor, J. L. Martin, T. Shochat, J. Corey-Bloom, and S. Ancoli-Israel, 2009, Melatonin fails to improve sleep or agitation in double-blind randomized placebo-controlled trial of institutionalized patients with Alzheimer disease: *Am J Geriatr Psychiatry*, v. 17, p. 166-9.

- Ghali, L., R. W. Hopkins, and P. Rindlisbacher, 1995, The fragmentation of rest/activity cycles in Alzheimer's disease: *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 10, p. 299-304.
- Golombek, D., and R. Rosenstein, 2010, Physiology of Circadian Entrainment: *Physiological Reviews*, v. 90, p. 1063-1102.
- Gooley, J. J., J. Lu, T. C. Chou, T. E. Scammell, and C. B. Saper, 2001, Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract: *Nat Neurosci*, v. 4, p. 1165.
- Gusek, W., 1983, [Histology of the pineal gland in the elderly human]: *Aktuelle Gerontologie*, v. 13, p. 111-114.
- Hamada, T., S. Yamanouchi, A. Watanabe, S. Shibata, and S. Watanabe, 1999, Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythm in vitro: *Brain Research*, v. 836, p. 190-193.
- Hannibal, J., and J. Fahrenkrug, 2002, Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock?: *Ann Med*, v. 34, p. 401-7.
- Hardy, J., and D. J. Selkoe, 2002, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics: *Science*, v. 297, p. 353-356.
- Hastings, M. H., 1997, Circadian clocks: *Curr Biol*, v. 7, p. R670-2.
- Hastings, M. H., and M. Goedert, 2013, Circadian clocks and neurodegenerative diseases: time to aggregate?: *Current opinion in neurobiology*, v. 23, p. 880-887.
- Hatfield, C., J. Herbert, E. Van Someren, J. Hodges, and M. Hastings, 2004, Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia: *Brain*, v. 127, p. 1061-1074.
- Hattar, S., H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson, and K. W. Yau, 2002, Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity: *Science*, v. 295, p. 1065-70.
- Hazlerigg, D. G., F. J. Ebling, and J. D. Johnston, 2005, Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN, *Curr Biol*, v. 15: England, p. R449-50.
- Hobson, J. A., and E. F. Pace-Schott, 2002, The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning: *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, p. 679-693.
- Hofman, M. A., and D. F. Swaab, 1994, Alterations in circadian rhythmicity of the vasopressin-producing neurons of the human suprachiasmatic nucleus (SCN) with aging: *Brain Res*, v. 651, p. 134-42.

- Huether, G., B. Poeggeler, A. Reimer, and A. George, 1992, Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract: *Life sciences*, v. 51, p. 945-953.
- Illnerova, H., J. Vaněček, and K. Hoffmann, 1983, Regulation of the pineal melatonin concentration in the rat (*Rattus norvegicus*) and in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 74, p. 155-159.
- Iyo, M., H. Namba, K. Fukushi, H. Shinotoh, S. Nagatsuka, T. Suhara, Y. Sudo, K. Suzuki, and T. Irie, 1997, Measurement of acetylcholinesterase by positron emission tomography in the brains of healthy controls and patients with Alzheimer's disease: *The Lancet*, v. 349, p. 1805-1809.
- Jengeleski, C. A., R. E. Powers, D. T. O'Connor, and D. L. Price, 1989, Noradrenergic innervation of human pineal gland: abnormalities in aging and Alzheimer's disease: *Brain research*, v. 481, p. 378-382.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. De Vries, and S. M. Reppert, 1999, A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock: *Cell*, v. 96, p. 57-68.
- Johnson, L. V., W. P. Leitner, A. J. Rivest, M. K. Staples, M. J. Radeke, and D. H. Anderson, 2002, The Alzheimer's A $\beta$ -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, p. 11830-11835.
- Kalsbeek, A., S. Perreau-Lenz, and R. M. Buijs, 2006, A network of (autonomic) clock outputs: *Chronobiol Int*, v. 23, p. 521-35.
- Kessel, L., J. H. Lundeman, K. Herbst, T. V. Andersen, and M. Larsen, 2010, Age-related changes in the transmission properties of the human lens and their relevance to circadian entrainment: *J Cataract Refract Surg*, v. 36, p. 308-12.
- King, D. P., and J. S. Takahashi, 2000, Molecular genetics of circadian rhythms in mammals: *Annu Rev Neurosci*, v. 23, p. 713-42.
- Klaffke, S., and J. Staedt, 2006, Sundowning and circadian rhythm disorders in dementia: *Acta neurologica belgica*, v. 106, p. 168.
- Klein, D. C., and R. Y. Moore, 1979, Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyl-transferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus: *Brain research*, v. 174, p. 245-262.

- Ko, C. H., and J. S. Takahashi, 2006, Molecular components of the mammalian circadian clock: *Hum Mol Genet*, v. 15 Spec No 2, p. R271-7.
- Leak, R., and R. Moore, 2001, Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons: *Journal of Comparative Neurology*, v. 433, p. 312-334.
- Lee, C., J.-P. Etchegaray, F. R. Cagampang, A. S. Loudon, and S. M. Reppert, 2001, Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock: *Cell*, v. 107, p. 855-867.
- Lee, J. H., D. L. Bliwise, F. P. Ansari, F. C. Goldstein, J. S. Cellar, J. J. Lah, and A. I. Levey, 2007, Daytime sleepiness and functional impairment in Alzheimer disease: *The American journal of geriatric psychiatry*, v. 15, p. 620-626.
- Lee, M. G., O. K. Hassani, and B. E. Jones, 2005, Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle: *The journal of neuroscience*, v. 25, p. 6716-6720.
- Lehman, M. N., R. Silver, W. R. Gladstone, R. M. Kahn, M. Gibson, and E. L. Bittman, 1987, Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain: *J Neurosci*, v. 7, p. 1626-38.
- Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, and W. Mori, 1958, Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1: *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, p. 2587-2587.
- Lewy, A. J., V. K. Bauer, S. Ahmed, K. H. Thomas, N. L. Cutler, C. M. Singer, M. T. Moffit, and R. L. Sack, 1998, The human phase response curve (PRC) to melatonin is about 12 hours out of phase with the PRC to light: *Chronobiol Int*, v. 15, p. 71-83.
- Liu, C., D. Weaver, S. Strogatz, and S. Reppert, 1997a, Cellular construction of a circadian clock: Period determination in the suprachiasmatic nuclei: *Cell*, v. 91, p. 855-860.
- Liu, C., D. R. Weaver, X. Jin, L. P. Shearman, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, and S. M. Reppert, 1997b, Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock: *Neuron*, v. 19, p. 91-102.
- Liu, R. Y., J. N. Zhou, J. van Heerikhuize, M. A. Hofman, and D. F. Swaab, 1999, Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-epsilon4/4 genotype: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 84, p. 323-7.



- Lowrey, P. L., and J. S. Takahashi, 2004, Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization: *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 5, p. 407-41.
- Lupi, D., M. Semo, and R. G. Foster, 2012, Impact of age and retinal degeneration on the light input to circadian brain structures: *Neurobiol Aging*, v. 33, p. 383-92.
- Mahlberg, R., S. Walther, P. Kalus, G. Bohner, S. Haedel, F. M. Reischies, K.-P. Kühl, R. Hellweg, and D. Kunz, 2008, Pineal calcification in Alzheimer's disease: an in vivo study using computed tomography: *Neurobiology of aging*, v. 29, p. 203-209.
- Merikanto, I., E. Kronholm, M. Peltonen, T. Laatikainen, T. Lahti, and T. Partonen, 2012, Relation of chronotype to sleep complaints in the general Finnish population: *Chronobiol Int*, v. 29, p. 311-7.
- Middleton, B., J. Arendt, and B. STONE, 1996, Human circadian rhythms in constant dim light (8 lux) with knowledge of clock time: *Journal of sleep research*, v. 5, p. 69-76.
- Mills, J. N., R. Morgan, D. S. Minors, and J. M. Waterhouse, 1977, The free-running circadian rhythms of two schizophrenics: *Chronobiologia*, v. 4, p. 353-60.
- Mishima, K., T. Tozawa, K. Satoh, Y. Matsumoto, Y. Hishikawa, and M. Okawa, 1999, Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking: *Biological psychiatry*, v. 45, p. 417-421.
- Mochizuki, T., A. Crocker, S. McCormack, M. Yanagisawa, T. Sakurai, and T. E. Scammell, 2004, Behavioral state instability in orexin knock-out mice: *The Journal of neuroscience*, v. 24, p. 6291-6300.
- Monti, J. M., A. S. BaHammam, S. R. Pandi-Perumal, V. Bromundt, D. W. Spence, D. P. Cardinali, and G. M. Brown, 2013, Sleep and circadian rhythm dysregulation in schizophrenia: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 43, p. 209-16.
- Nishino, S., B. Ripley, S. Overeem, S. Nevsimalova, G. J. Lammers, J. Vankova, M. Okun, W. Rogers, S. Brooks, and E. Mignot, 2001, Low cerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy: *Annals of neurology*, v. 50, p. 381-388.
- Nitz, D., and J. M. Siegel, 1996, GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle: *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 40, p. R1707.
- Ohashi, Y., N. Okamoto, K. Uchida, M. Iyo, N. Mori, and Y. Morita, 1999, Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type: *Biological psychiatry*, v. 45, p. 1646-1652.

- Pappolla, M., Y.-J. Chyan, B. Poeggeler, B. Frangione, G. Wilson, J. Ghiso, and R. Reiter, 2000, An assessment of the antioxidant and the antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease: *Journal of neural transmission*, v. 107, p. 203-231.
- Peyron, C., J. Faraco, W. Rogers, B. Ripley, S. Overeem, Y. Charnay, S. Nevsimalova, M. Aldrich, D. Reynolds, and R. Albin, 2000, A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains: *Nature medicine*, v. 6, p. 991-997.
- Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. Van Den Pol, L. De Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe, and T. S. Kilduff, 1998, Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems: *The Journal of Neuroscience*, v. 18, p. 9996-10015.
- Pickard, G. E., and F. W. Turek, 1983, The suprachiasmatic nuclei: two circadian clocks?: *Brain research*, v. 268, p. 201-210.
- Pigeon, W. R., M. Hegel, J. Unützer, M.-Y. Fan, M. J. Sateia, J. M. Lyness, C. Phillips, and M. L. Perlis, 2008, Is insomnia a perpetuating factor for late-life depression in the IMPACT cohort?: *Sleep*, v. 31, p. 481.
- Pollak, C. P., and P. E. Stokes, 1997, Circadian rest-activity rhythms in demented and nondemented older community residents and their caregivers: *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 45, p. 446-452.
- Rajaratnam, S. M., B. Middleton, B. M. Stone, J. Arendt, and D.-J. Dijk, 2004, Melatonin advances the circadian timing of EEG sleep and directly facilitates sleep without altering its duration in extended sleep opportunities in humans: *The Journal of physiology*, v. 561, p. 339-351.
- Redline, S., H. L. Kirchner, S. F. Quan, D. J. Gottlieb, V. Kapur, and A. Newman, 2004, The effects of age, sex, ethnicity, and sleep-disordered breathing on sleep architecture: *Archives of Internal Medicine*, v. 164, p. 406-418.
- Reiter, R. J., D.-x. Tan, J. C. Mayo, R. M. Sainz, J. Leon, and Z. Czarnocki, 2003, Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans: *Acta Biochemica Polonica- English*, v. 50, p. 1129-1146.
- Reppert, S. M., 1997, Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors: *Journal of biological rhythms*, v. 12, p. 528-531.
- Reppert, S. M., M. J. Perlow, L. Tamarkin, and D. C. Klein, 1979, A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid: *Endocrinology*, v. 104, p. 295-301.

- Reppert, S. M., and D. R. Weaver, 2002, Coordination of circadian timing in mammals: *Nature*, v. 418, p. 935-41.
- Rusak, B., and I. Zucker, 1979, Neural regulation of circadian rhythms: *Physiol Rev*, v. 59, p. 449-526.
- Sack, R. L., R. W. Brandes, A. R. Kendall, and A. J. Lewy, 2000, Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people: *New England Journal of Medicine*, v. 343, p. 1070-1077.
- Sadun, A. A., and C. J. Bassi, 1990, Optic nerve damage in Alzheimer's disease: *Ophthalmology*, v. 97, p. 9-17.
- Sahar, S., and P. Sassone-Corsi, 2009, Metabolism and cancer: the circadian clock connection: *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p. 886-896.
- Saper, C. B., T. C. Chou, and T. E. Scammell, 2001, The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness: *Trends in neurosciences*, v. 24, p. 726-731.
- Saper, C. B., T. E. Scammell, and J. Lu, 2005, Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms: *Nature*, v. 437, p. 1257-63.
- Sharma, M., J. Palacios-Bois, G. Schwartz, H. Iskandar, M. Thakur, R. Quirion, and N. Nair, 1989, Circadian rhythms of melatonin and cortisol in aging: *Biological psychiatry*, v. 25, p. 305-319.
- Sherin, J., P. Shiromani, R. McCarley, and C. Saper, 1996, Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep: *Science*, v. 271, p. 216-219.
- Sosniyenko, S., R. A. Hut, S. Daan, and A. Sumová, 2009, Influence of photoperiod duration and light–dark transitions on entrainment of *Per1* and *Per2* gene and protein expression in subdivisions of the mouse suprachiasmatic nucleus: *European Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 1802-1814.
- Stephan, F., 2002, The "other" circadian system: Food as a zeitgeber: *Journal of Biological Rhythms*, v. 17, p. 284-292.
- Stopa, E. G., L. Volicer, V. Kuo-Leblanc, D. Harper, D. Lathi, B. Tate, and A. Satlin, 1999, Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia: *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 58, p. 29-39.
- Storch, K.-F., O. Lipan, I. Leykin, N. Viswanathan, F. C. Davis, W. H. Wong, and C. J. Weitz, 2002, Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart: *Nature*, v. 417, p. 78-83.

- Takahashi, J. S., H.-K. Hong, C. H. Ko, and E. L. McDearmon, 2008, The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease: *Nature Reviews Genetics*, v. 9, p. 764-775.
- Teclemariam-Mesbah, R., G. J. Ter Horst, F. Postema, J. Wortel, and R. M. Buijs, 1999, Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway: *J Comp Neurol*, v. 406, p. 171-82.
- Thannickal, T. C., R. Y. Moore, R. Nienhuis, L. Ramanathan, S. Gulyani, M. Aldrich, M. Cornford, and J. M. Siegel, 2000, Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy: *Neuron*, v. 27, p. 469-474.
- Turek, F. W., C. Joshu, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, and D. R. Jensen, 2005, Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice: *Science*, v. 308, p. 1043-1045.
- Van Den Heuvel, C. J., S. A. Ferguson, M. Mila Macchi, and D. Dawson, 2005, Melatonin as a hypnotic: *con: Sleep medicine reviews*, v. 9, p. 71-80.
- Van Someren, E. J., 2000, Circadian and sleep disturbances in the elderly: *Exp Gerontol*, v. 35, p. 1229-37.
- van Someren, E. J., E. E. Hagebeuk, C. Lijzenga, P. Scheltens, S. E. de Rooij, C. Jonker, A.-M. Pot, M. Mirmiran, and D. F. Swaab, 1996, Circadian rest—activity rhythm disturbances in alzheimer's disease: *Biological psychiatry*, v. 40, p. 259-270.
- Van Someren, E. J., A. Kessler, M. Mirmiran, and D. F. Swaab, 1997, Indirect bright light improves circadian rest-activity rhythm disturbances in demented patients: *Biological psychiatry*, v. 41, p. 955-963.
- Vaněček, J., A. Pavlík, and H. Illnerová, 1987, Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography: *Brain research*, v. 435, p. 359-362.
- Vinzio, S., A. Ruellan, A. E. Perrin, J. L. Schlienger, and B. Goichot, 2003, Actigraphic assessment of the circadian rest-activity rhythm in elderly patients hospitalized in an acute care unit: *Psychiatry Clin Neurosci*, v. 57, p. 53-8.
- Vitiello, M. V., P. N. Prinz, D. E. Williams, M. S. Frommlet, and R. K. Ries, 1990, Sleep disturbances in patients with mild-stage Alzheimer's disease: *Journal of Gerontology*, v. 45, p. M131-M138.
- Watts, A. G., L. W. Swanson, and G. Sanchez Watts, 1987, Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat: *Journal of Comparative Neurology*, v. 258, p. 204-229.

- Weitzman, E. D., M. L. Moline, C. A. Czeisler, and J. C. Zimmerman, 1983, Chronobiology of aging: temperature, sleep-wake rhythms and entrainment: *Neurobiology of aging*, v. 3, p. 299-309.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, M. Meister, and S. M. Reppert, 1995, Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms: *Neuron*, v. 14, p. 697-706.
- Wever, R. A., J. Polášek, and C. M. Wildgruber, 1983, Bright light affects human circadian rhythms: *Pflügers Archiv*, v. 396, p. 85-87.
- Whitehouse, P. J., D. L. Price, A. W. Clark, J. T. Coyle, and M. R. DeLong, 1981, Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis: *Annals of neurology*, v. 10, p. 122-126.
- Wilcock, G., M. Esiri, D. Bowen, and C. Smith, 1982, Alzheimer's disease: correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities: *Journal of the neurological sciences*, v. 57, p. 407-417.
- Wirz-Justice, A., C. Cajochen, and P. Nussbaum, 1997, A schizophrenic patient with an arrhythmic circadian rest-activity cycle: *Psychiatry Res*, v. 73, p. 83-90.
- Witting, W., I. H. Kwa, P. Eikelenboom, M. Mirmiran, and D. F. Swaab, 1990, Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease: *Biol Psychiatry*, v. 27, p. 563-72.
- Wu, Y.-H., M. G. Feenstra, J.-N. Zhou, R.-Y. Liu, J. S. Toranó, H. J. Van Kan, D. F. Fischer, R. Ravid, and D. F. Swaab, 2003, Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages: *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, v. 88, p. 5898-5906.
- Wu, Y.-H., D. F. Fischer, A. Kalsbeek, M.-L. Garidou-Boof, J. van der Vliet, C. van Heijningen, R.-Y. Liu, J.-N. Zhou, and D. F. Swaab, 2006, Pineal clock gene oscillation is disturbed in Alzheimer's disease, due to functional disconnection from the "master clock": *The FASEB Journal*, v. 20, p. 1874-1876.
- Wu, Y. H., and D. F. Swaab, 2005, The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease: *J Pineal Res*, v. 38, p. 145-52.
- Wu, Y. H., and D. F. Swaab, 2007, Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease: *Sleep Med*, v. 8, p. 623-36.
- Wulff, K., S. Gatti, J. G. Wettstein, and R. G. Foster, 2010, Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease: *Nature Reviews Neuroscience*, v. 11, p. 589-599.

- Yagita, K., F. Tamanini, G. T. van der Horst, and H. Okamura, 2001, Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts: *Science*, v. 292, p. 278-281.
- Yoo, S.-H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Siepk, H.-K. Hong, W. J. Oh, and O. J. Yoo, 2004, PERIOD2:: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 5339-5346.
- Zeitzer, J. M., J. E. Daniels, J. F. Duffy, E. B. Klerman, T. L. Shanahan, D. J. Dijk, and C. A. Czeisler, 1999, Do plasma melatonin concentrations decline with age?: *Am J Med*, v. 107, p. 432-6.
- Zhao, Z.-Y., Y. Xie, Y.-R. Fu, A. Bogdan, and Y. Touitou, 2002, Aging and the circadian rhythm of melatonin: a cross-sectional study of Chinese subjects 30-110 yr of age: *Chronobiology international*, v. 19, p. 1171-1182.
- Zhdanova, I. V., K. Masuda, C. Quasarano-Kourkoulis, D. L. Rosene, R. J. Killiany, and S. Wang, 2011, Aging of Intrinsic Circadian Rhythms and Sleep in a Diurnal Nonhuman Primate, *Macaca mulatta*: *Journal of Biological Rhythms*, v. 26, p. 149-159.
- Zhdanova, I. V., R. J. Wurtman, C. Morabito, V. R. Piotrovskaya, and H. J. Lynch, 1996, Effects of low oral doses of melatonin, given 2-4 hours before habitual bedtime, on sleep in normal young humans: *Sleep-New York*, v. 19, p. 423-431.
- Zhou, J.-N., R.-Y. Liu, W. Kamphorst, M. A. Hofman, and D. F. Swaab, 2003a, Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels: *Journal of Pineal Research*, v. 35, p. 125-130.
- Zhou, J. N., M. A. Hofman, and D. F. Swaab, 1995, VIP neurons in the human SCN in relation to sex, age, and Alzheimer's disease: *Neurobiol Aging*, v. 16, p. 571-6.
- Zhou, J. N., R. Y. Liu, J. Heerikhuizen, M. A. Hofman, and D. F. Swaab, 2003b, Alterations in the circadian rhythm of salivary melatonin begin during middle age: *Journal of pineal research*, v. 34, p. 11-16.